

**Expression von Corticosteroid-bindendem
Globulin/CBG im Cerebellum der Ratte während
der Postnatalentwicklung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Stefanie Lippold
geboren am 30.05.1983 in Greiz

Gutachter

1. Prof. Dr. Gustav Jirikowski, Jena
2. Prof. Dr. Karl-Jürgen Bär, Jena
3. Prof. Dr. Hans Gert Bernstein, Magdeburg

Abkürzungsverzeichnis

µm	-	Mikrometer
Abb.	-	Abbildung
ACTH	-	Adrenocorticotropes Hormon
APES	-	3-Aminopropyltriethoxysilan
CBG	-	Corticosteroid-bindendes Globulin
CRF	-	Corticotropin-Releasing Factor
CRH	-	Corticotropin-Releasing Hormon
DDSA	-	Dodecenyln-Bernsteinsäureanhydrid
DMP 30	-	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl-)-phenol
ERβ	-	Estrogenreceptor beta
et al.	-	et alii/ et aliae/ et alia
GABA	-	Gamma-aminobutyric acid
H ₂ O ₂	-	Wasserstoffperoxid
HCl	-	Chlorwasserstoff
HPA-Achse	-	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IgG	-	Immunglobulin G
kDa	-	Kilodalton
mg/ l	-	Milligramm pro Liter
ml	-	Milliliter
mm	-	Millimeter
mM	-	Millimolar
MNA	-	Methylnacidanhydrid
mRNA	-	messenger RNA, messenger ribonucleic acid
NaOH	-	Natriumhydroxid

Ncll.	-	Nuclei
NGF	-	Nerve Growth Factor
PAP	-	Peroxidase Anti-Peroxidase
PBS	-	Phosphate buffered saline
pH	-	pondus Hydrogenii
PNT	-	Postnataltag
RT	-	Raumtemperatur
RT-PCR	-	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SHBG	-	Sexualhormon-bindendes Globulin
Tab.	-	Tabelle
TBS	-	Tris buffered saline
TRPM3	-	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily M, Member 3
UCN	-	Urocortin
VDR	-	1,25-dihydroxyvitamin D3-Rezeptor
ZNS	-	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	VII
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Anatomie und Funktion des Kleinhirns des Menschen	3
2.2 Entwicklung cerebellärer Regelkreise	6
2.3 Bedeutung von Steroidhormonen im Kleinhirn	9
2.4 CBG – ein Steroidbindungshormon	11
2.5 Zielsetzung der Arbeit	13
3 MATERIALIEN UND METHODEN	14
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
3.2 Chemikalien	15
3.2.1 Substanzen	15
3.2.2 Lösungen und Puffer	17
3.2.3 Antikörper	19
3.3 Untersuchungsmaterial	19
3.4 Töten der Versuchstiere	20
3.5 Gewebepräparation	20
3.6 histologische Aufarbeitung	20
3.7 Beschichtung der Objektträger mit APES	20
3.8 Kunstharzeinbettung	21

3.9	Herstellung von Semidünnschnitten	22
3.10	Entharzen der Schnitte	23
3.11	Immunhistochemische Aufbereitung	23
3.12	Mikroskopische Auswertung	25
4	ERGEBNISSE	26
5	DISKUSSION	36
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	46
7	LITERATURVERZEICHNIS	48
8	ANHANG	57
8.1	Lebenslauf	57
8.2	Danksagung	58
8.3	Ehrenwörtliche Erklärung	59

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABB.01:	Cerebellum von kaudal-ventral (modifiziert nach Voss/ Herrlinger, 1976)	3
ABB.02:	Cortex cerebelli	4
ABB.03:	Progesteron als Grundgerüst der Corticosteroide	9
ABB.04:	EPON 812-Blöcke mit Anschnitt des Gewebes	21
ABB.05:	Ultramikrotom Ultracut S der Firma Leica	22
ABB.06:	Entnahme der Schnitte zum Transfer auf die OT	22
ABB.07:	3-schichtiger Cortex, 1.PNT, Übersichtsfärbung Methylenblau	26
ABB.08:	Immunreaktivität CBG, 1.PNT, Färbung: JenChromPx	26
ABB.09:	Immunreaktivität CBG, 1.PNT, Färbung: JenChromPx	26
ABB.10:	2.PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau	27
ABB.11:	2.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	27
ABB.12:	5.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	28
ABB.13:	5.PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau	28
ABB.14:	7.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	29
ABB.15:	9.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	29
ABB.16:	7.PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau	29
ABB.17:	11.PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau	30
ABB.18:	11.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	30
ABB.19:	13.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	31
ABB.20:	14.PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau	31
ABB.21:	14.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	31
ABB.22:	vergrößerter Bildausschnitt aus Abb.20	32

ABB.23:	16.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	32
ABB.24:	18.PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau	33
ABB.25:	22.PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau	33
ABB.26:	18.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	33
ABB.27:	20.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	33
ABB.28:	22.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	33
ABB.29:	24.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	33
ABB.30:	26.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	34
ABB.31:	28.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	34
ABB.32:	30.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	34
ABB.33:	32.PNT, CBG, Färbung: JenChromPx	34
TAB.01:	Verteilung der Immunreaktivität für CBG	35

1 Zusammenfassung

Das Corticosteroid-bindende Globulin (CBG), ein heterodimeres Steroidtransportprotein mit einer hohen Affinität zu Glucocorticoiden, wird neben seinem Hauptproduktionsort der Leber in verschiedenen Geweben exprimiert. Die möglichen Funktionen des CBG sind vielfältig und übersteigen die eines einfachen Steroidtransporters vermutlich bei Weitem.

Die Zielstellung und Aufgabe dieser Arbeit war es, mittels Immunhistochemie die Verteilung von CBG während der postnatalen Entwicklung im Kleinhirn, vor allem in der Kleinhirnrinde der Ratte zu untersuchen. Der Zeitraum der Untersuchungen erstreckte sich dabei auf den 1. bis 32. Postnataltag. Besonderes Augenmerk galt der Morphologie, der Plastizität sowie der speziellen Verteilung der CBG-Expression in den einzelnen Zellgruppen des Kleinhirns.

Unsere Untersuchungen zeigten neben den entwicklungsbedingten morphologischen Veränderungen der Kleinhirnrinde eine gegensätzliche ab- beziehungsweise zunehmende Immunreaktivität für CBG in den Purkinje- und Körnerzellen während der ersten fünf Postnataltage. Veränderungen in der Altersentwicklung korrelieren zeitversetzt mit bekannten Veränderungen der adrenalen Steroidspiegel. Ab dem 5. Postnataltag konnten wir einen stetigen Abfall der Immunreaktivität für CBG verzeichnen. Dies gilt vor allem für die Purkinjezellen. Die Verringerung der Immunreaktivität verlief nicht kontinuierlich; ein erneuter Anstieg war am 22. Postnataltag zu verzeichnen. Ein Peak in der CBG-Expression am 22. Postnataltag in den Purkinjezellen stützt die These der veränderten Steroidspiegel während altersspezifischen Entwicklungen. Der Verstoß des Jungtieres aus dem Nestgefüge als wahrscheinlicher Stressor findet um den 21. Postnataltag statt. Der Glucocorticoid-Plasmaspiegel wird so von Stressfaktoren aus der Umwelt reguliert. Ein Indikator dafür könnte die qualitative Untersuchung der Immunreaktivität für CBG, mit besonderer Berücksichtigung der zellulären Lokalisation vor allem in Purkinjezellen (im Dendriten, cytoplasmatisch und nucleär), sowie von Körnerzellen und Interneuronen, sein.

Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Bindungsglobulin auch beim intrazellulären Transport von Glucocorticoiden eine Rolle spielt und vermutlich bei deren Transfer in den Zellkern beteiligt ist. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Experimente sprechen für eine intrinsische Expression von CBG im Kleinhirn. Auf Grund seiner Größe ist es unwahrscheinlich, dass CBG die Blut-Hirn-Schranke überwindet.

Die Vielfältigkeit der möglichen Funktionen von CBG schließt eine Wirkung als neurotroper Faktor bei der Kleinhirnentwicklung ein.

2 Einleitung

2.1 Anatomie und Funktion des Kleinhirns des Menschen

Das Kleinhirn ist durch drei Kleinhirnstiele mit dem Hirnstamm verbunden, über welche es Afferenzen empfängt und Efferenzen entsendet.

Von außen ist eine Aufteilung in zwei Hemisphären mit dem dazwischen liegenden Vermis zu erkennen. Kaudal des Vermis findet man den Lobus flocculonodularis, lateral-kaudal die Tonsillae cerebelli (Trepel, 2004).

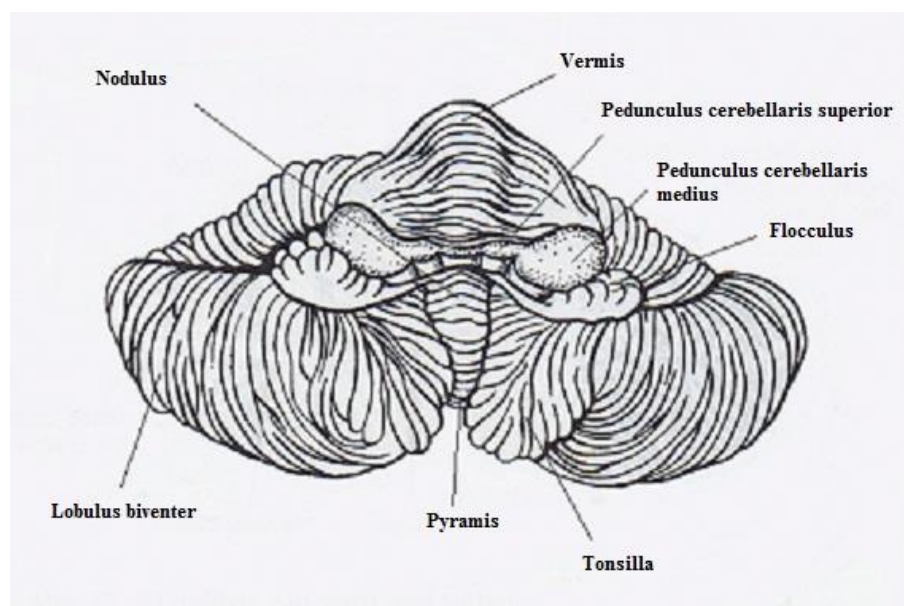


Abb. 01: Cerebellum von kaudal-ventral (modifiziert nach Voss/Herrlinger, 1976)

Funktionell lassen sich drei große Bereiche des Kleinhirns unterscheiden: das Vestibulocerebellum als phylogenetisch ältester Teil (Schiebler et. al, 1999), bestehend aus dem Lobus flocculonodularis, welches mit Kernen des Vestibularapparates

verbunden ist und durch Afferenzen für die Gleichgewichtsmotorik zuständig ist (Welsch, 2006). Das Spinocerebellum, welches den Vermis und die paravermale Zone umfasst und über die spinocerebellären Bahnen für die Stütz- und Haltemotorik zuständig ist. Das Pontocerebellum als dritter funktioneller Bereich, besteht zum größten Teil aus den beiden Hemisphären und erhält über die Ncll. pontis seine Afferenzen aus dem prämotorischen Kortex (Welsch, 2006; Trepel, 2004).

Der große Zellreichtum des Cortex cerebelli ist auf die Vielzahl an regulativen Funktionen zurückzuführen (Trepel, 2004). Mikroskopisch lässt sich der Cortex in drei Schichten gliedern: von außen nach innen sind ein faserreiches Stratum moleculare, das Stratum purkinjense und das Stratum granulosum zu unterscheiden (Abb.02).

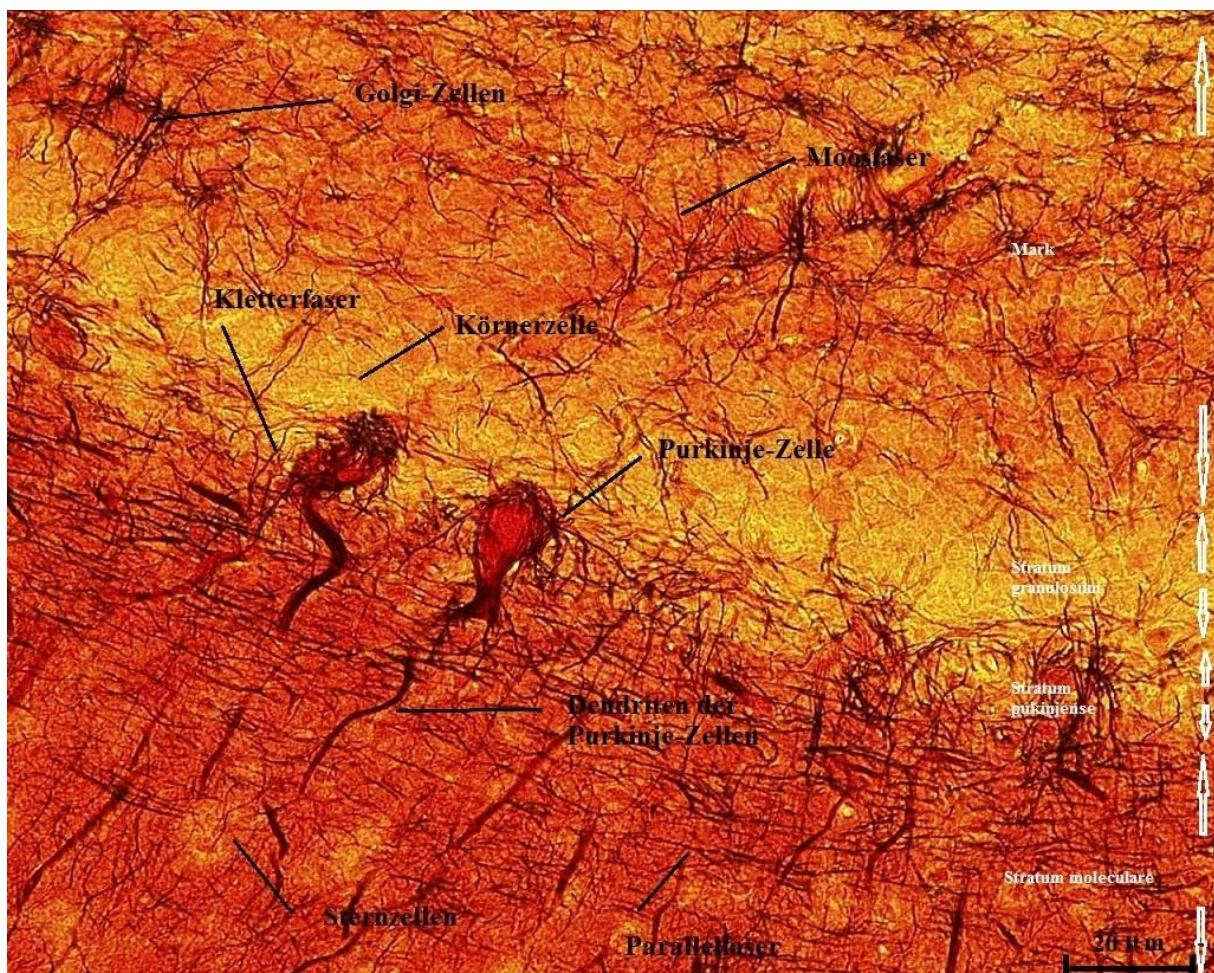


Abb. 02: Cortex cerebelli

Die Purkinje-Zellschicht enthält die Perikaryen der, mit einem Durchmesser von 50-70 Mikrometer auffällig großen Purkinje-Zellen in einschichtiger Anordnung (Schiebler et al., 1999). Diese Zellen stellen die einzigen efferenten Zellen der Kleinhirnrinde dar. Zwischen den Perikarya sind die Zellleiber der Bergmann-Gliazellen zu finden. Die Schicht ist außerdem durchsetzt von Golgi-Zell-Dendriten, Axonen der Korbzellen sowie Kletter- und Parallelfasern (Benninghoff et al., 1994). Die zellreichste Schicht des Kleinhirns, das Stratum granulosum, enthält mit seinen Körnerzellen die einzigen erregenden Zellen des Cortex cerebelli. Desweiteren findet man die inhibitorischen Golgi-Zellen, deren Dendriten von Parallel- und Kletterfasern aktiviert werden und die aus dem Mark aufsteigenden Moosfasern (Welsch, 2006; Trepel, 2004). Die im Stratum moleculare verlaufenden Axone sind größtenteils nicht myelinisiert. Es enthält Dendriten von Purkinje-Zellen, welche bis zur Kortexoberfläche reichen, Kletterfasern, Parallelfasern, sowie Dendriten von Golgi-, Stern-, Korb- und Fortsätze der Bergmann- Gliazellen (Benninghoff et al.,1994).

Die Hauptfunktionen des Kleinhirns umfassen die Koordination der Motorik, die Feinabstimmung der distalen Zielmotorik, sowie die Beeinflussung des Muskeltonus. Die Ausführung der Funktionen läuft unbewusst ab (Schiebler et al., 1999). Über das Vestibulocerebellum werden Informationen über Körperlage und –bewegung verwertet, es hat indirekt Einfluss auf die Stützmotorik. Über das Spinocerebellum wird der Muskeltonus und die Bewegung vor allem proximaler Extremitätenmuskeln beeinflusst. Das Pontocerebellum übernimmt Funktionen beim Erlernen und der Feinabstimmung von willkürlichen Bewegungen (Trepel, 2004).

Zusammenfassend kann man bemerken, dass die Funktionen des Kleinhirns im Rahmen von Regelkreisen und Rückkopplungsmechanismen ausgeführt werden (Schiebler et al., 1999). Es stellt als Ganzes die höchste Instanz zur Kontrolle von Koordination und der feinen Abstimmung von Bewegungsabläufen dar (Trepel, 2004).

2.2 Entwicklung cerebellärer Regelkreise

Das Kleinhirn entsteht aus der dorsalen Anlage des Rautenhirns, links und rechts des vierten Ventrikels, am Ende der Embryonalperiode (Drews, 2006). Bei der Geburt ist bei fast allen Säugetieren dieser Teil des ZNS weitgehend unentwickelt. Lediglich das Archicerebellum, als phylogenetisch ältester Anteil, sowie die Kleinhirnerne sind entwickelt und die Hemisphären sind erkennbar.

Das Cerebellum besteht aus dem Cortex sowie dem Mark, in dem sich eine Reihe von tiefliegenden Kernen befinden. Der Aufbau der Kleinhirnrinde ähnelt dem der Großhirnrinde, mit dem Unterschied, dass die Großhirnrinde im Gegensatz zur Kleinhirnrinde aus sechs Schichten besteht. Während der Kleinhirnentwicklung wandert frühzeitig eine Schicht von Zellen aus, die ausschließlich von der Rautenlippe des Metencephalons abstammt, und bildet eine Schicht unter den Gliazellen über die Oberfläche des sich entwickelnden Kleinhirns. Diese Zellen formen die äußere Keimschicht und in der späteren Entwicklung werden ihre Abkömmlinge ventriculopetal ins Kleinhirn auswandern. Das Kleinhirn hat während seines Wachstums demnach einen intraventrikulären und einen extraventrikulären Anteil. Als Extroversion des Kleinhirns bezeichnet man die Vergrößerung des extraventrikulären Anteils auf Kosten des intraventrikulären.

Die frühe bilaterale Ausdehnung der ventrikulären Oberfläche spiegelt die Bildung von Neuroblasten, Kleinhirnerne und efferenten Neuronen der Kleinhirnrinde wider. Die sternförmigen Gliazellen spielen beim Begleiten der Purkinjezellen zur meningealen Oberfläche der Kleinhirnanlage eine Rolle. Während dieses frühen Stadiums der Kleinhirnentwicklung, welches von der Entstehung und dem Auswandern von efferenten cerebellären Neuronen geprägt ist, bleibt die Oberfläche der cerebellären Anlage weich. Die Extroversion des Kleinhirns beginnt später, wenn Zellen der äußeren Körnerschicht zu proliferieren und auszuwandern beginnen. Diese Zellen produzieren die Körnerzellen. Diese wandern entlang der Gliazellen durch die Purkinjezellschicht nach innen und siedeln sich in der Körnerschicht an. Die Proliferation und Auswanderung von Körnerzellen führt zu einer großen rostrakaudalen Vergrößerung der meningealen Kleinhirnoberfläche, indem die Querfissuren entstehen und die mehrschichtige Purkinjezellschicht einschichtig wird. Die

Purkinjezellen werden vor den Körnerzellen gebildet, welche den Empfänger des primär afferenten Moosfasersystems darstellen. Aus diesem Grund geht die Entwicklung der efferenten Neurone der Kleinhirnrinde und Kerne der Entwicklung seiner afferenten Gliederung voraus. Wenn die externe Keimschicht anfänglich gebildet wird, ist die vielzellige Purkinjezellschicht nicht einheitlich, sondern in Ansammlungen unterteilt, die rostrokaudal sich ausbreitende Säulen bildet. Die medialen Gruppierungen von Purkinjezellen entwickeln sich zum zukünftigen Vermis. Diese Purkinjezellen werden Axone ausbilden, die mit Neuronen im Nucleus vestibularis und Nucleus fastigii verschaltet werden. Die lateralen Ansammlungen gehören zu den zukünftigen Hemisphären und bilden Axone, die in zwischengeschalteten Kernen und im Nucleus dentatus enden. Die scharfe Grenze der efferenten Projektionen des Vermis und der Hemisphären ist demzufolge bereits frühzeitig festgelegt. Diese Gruppierungen führen zur Entstehung von Purkinjezellbereichen im adulten Kleinhirn, die zu einem einzelnen vestibulären Kern oder Kleinhirnkern projizieren (Standring, 2005).

Der dreischichtige Cortex ist einer enormen Plastizität unterworfen, die vor allem für die cerebellären Körnerzellen weiterbesteht. Die Körnerzellen gehören zu den zentralen Neuronen, die zeitlebens zur Proliferation befähigt sind. Zellen des Cortex cerebelli stammen aus unterschiedlichen Proliferationszonen; einer Ventrikulärzone und einem Stratum granulosum externum (übrige Zellen des Cortex).

Die Plastizität, insbesondere die Synaptogenese ist vor allem bei Nagetieren in kritischen Phasen der Entwicklung besonders aktiv. Die Erste dieser Phasen ist die Geburt, die Zweite um den 7. Postnataltag, an welchem die Tiere ihre Augen öffnen, die Dritte um den 20. Postnataltag, an dem das Nest verlassen wird und schließlich das Einsetzen der Geschlechtsreife und die Vertreibung des Jungtieres durch das Muttertier um den 30. Postnataltag. Alle diese beschriebenen Vorgänge sind mit Stress und dementsprechend mit einem Anstieg des systemischen Glucocorticoidspiegels verbunden (Goukko et al., 2008).

In cerebellären Regelkreisen entwickeln sich als Erstes die Kollateralen zu den Pyramidenbahnen; der olivocerebelläre Regelkreis. Dieser bildet als Kletterfasern Synapsen an den Dendriten der Purkinjezellen. Anschließend entwickelt sich mit der Entstehung von Kernarealen in der Brücke der pontocerebelläre Regelkreis. Efferenzen der Brückenkerne

finden sich als Moosfasern in den Körnerzellen. Schließlich entstehen Kollateralen des Spinocerebellums als Rückmeldung der spinalen Afferenzen, welche als Moosfasern in den Körnerzellen des Vermis und der paravermalen Zone terminieren. Diese Vorgänge korrelieren mit den erwähnten Entwicklungsstufen.

2.3 Bedeutung von Steroidhormonen im Kleinhirn

Corticosteroide werden in der Nebennierenrinde gebildet und entstehen aus Cholesterin. Progesteron stellt das gemeinsame Grundgerüst der Hormone. Die Differenzierung der verschiedenen Hormone geschieht durch Hydroxylierung und Oxidation der Gruppen zu Keto- oder Aldehydgruppen an unterschiedlichen Positionen (Abb.03).

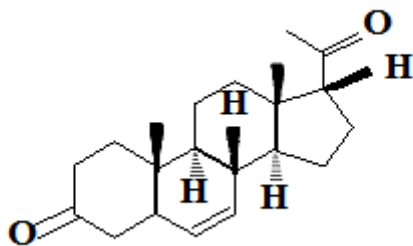


Abb. 03: Progesteron als Grundgerüst der Corticosteroide

Das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) der Hypophyse, das Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) des Hypothalamus sowie das Cortisol als Steroid der Nebennierenrinde bilden dosisabhängige Rückkopplungsmechanismen, als Teil eines physiologischen Stress-Systems: der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse).

Steroidhormone sind lipophile Moleküle, die aufgrund dieser Eigenschaft die Blut-Hirn-Schranke leicht überwinden können. Sie wirken über klassische Kernrezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren die Proteinsynthese steuern können. Glucocorticoide steuern im zentralen Nervensystem (ZNS) beispielsweise das Sexualverhalten, das Stressverhalten, haben Einfluss auf das Lernen und auf die Entstehung von Emotionen (Tasker, 2006).

Neben den bekannten genomischen Wirkungen, werden in der Literatur schnelle nichtgenomische Wirkungen diskutiert, die über Membranrezeptoren erklärt werden. Die morphologischen Veränderungen im Cerebellum während der postnatalen Entwicklung korrelieren mit endogenen Schwankungen des Steroidspiegels. Inwieweit die Kleinhirnrinde Glucocorticoidrezeptoren exprimiert, konnte noch nicht gezeigt werden.

Corticosteroide werden auch aus dem mütterlichen Kreislauf in das Blut des Feten aufgenommen und stimulieren die Lungenentwicklung. Bei Frühgeborenen kommt die Gabe von Glucocorticoid-Agonisten zur Prophylaxe und Therapie einer bronchopulmonalen Dysplasie zum Einsatz. In der Literatur wird eine im Tierversuch gezeigte Störung der frühen Kleinhirnentwicklung nach der perinatalen Gabe von Glucocorticoiden beschrieben (Tam et al., 2011).

Das Kleinhirn verhält sich enorm plastisch. Bei Kindern, die einen hohen Cortisonschub während der Schwangerschaft erfahren haben, kann sich nachweislich ein hyperkinetisches Syndrom ausbilden (Huang et al., 2001).

2.4 CBG – ein Steroidbindungshormon

Das Corticosteroid-bindende Globulin (CBG) ist ein heterodimeres Plasmaprotein aus der Gruppe der α 1-Globuline. Die Expression von CBG konnte in verschiedenen Geweben, neben der Leber als Ort der Hauptproduktion (Hammond et al., 1991) gezeigt werden. Vor allem im ZNS, insbesondere im Liquor cerebrospinalis und in Axonen des hypothalamo-hypophysären Systems, sowie in Purkinje-Zellen und den Moosfasern im Cerebellum konnte CBG nachgewiesen werden (Jirikowski et al., 2007).

CBG hat ein Molekulargewicht von ca. 52kDa und kommt normalerweise im Plasma in einer relativ konstanten Konzentration von etwa 40 mg/l vor. Die Plasmakonzentration ist allerdings einer dynamischen Regulation unterworfen. Akute Stresssituationen können zu einem deutlichen Abfall des Plasma-CBGs führen (McKay et al., 2000). Auch sind gewisse zirkadiane Rhythmen der Plasma- und Serumkonzentration von CBG nachgewiesen worden (Hsu und Kuhn, 1988; Lewis et al., 2006)

98% der Serumglucocorticoide sind an CBG gebunden. Die möglichen Funktionen von CBG sind wahrscheinlich vielfältig. CBG könnte freie Glucocorticoide puffern, da nur ungebundenes Cortison eine biologische Aktivität aufweist (Mendel, 1989). Desweiteren könnte die Bioverfügbarkeit von Glucocorticoiden erhöht werden, da der enzymatische Abbau von Glucocorticoiden blockiert wird. Die Regulation der renalen Clearance und die Bereitstellung von Hormonen in den Zielgeweben könnten durch eine Wirkung als Transportprotein begünstigt werden (Hammond et al., 1991; Breuner und Orchinik 2002; Dey und Roychowdhury, 2003). Eine weitere mögliche Funktion stellt die Beteiligung an der Vermittlung von nicht-genomischen Effekten des Cortisols an Zellmembranen dar (Rosner et al., 1988). Eine spezifische rezeptorähnliche Bindungsformation für CBG konnte gezeigt werden (Hryb et al., 1986; Strel'chyonok und Avvakumov, 1991). Die Rolle des CBG im Gehirn ist noch weitgehend ungeklärt. Es könnte hohe Konzentrationen von Glucocorticoiden mit ihrer zytotoxischen Wirkung auf Neurone abpuffern (Sapolsky, 1993). Infusionen von CBG verändern die zentrale Stressantwort. Versuche an transgenen Mäusen, an welchen das CBG ausgeschaltet wurde, zeigten Veränderungen in Gedächtnis und der Stressantwort

(Richard et al., 2010). Steroide spielen eine bedeutende Rolle im Rahmen der Motorik und Stressantwort.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel und Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, mittels immunhistochemischer Methoden die Verteilung des Corticosteroid-bindenden Globulins während der postnatalen Entwicklung im Kleinhirn der Ratte zu ermitteln. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Plastizität und die spezielle Verteilung in den Zellen des Cerebellums gelegt werden.

Die Beobachtung und Beurteilung der Expression des CBG erfolgte dabei an Präparaten des Kleinhirns in einem Zeitraum vom 1. bis 32. Postnataltag.

Mögliche Parallelen mit den verschiedenen Entwicklungsstufen der Ratte im untersuchten Zeitraum sollten diskutiert werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

<u>A</u> xiovert 200 Mikroskop	Carl Zeiss AG Jena
<u>C</u> ytomation Pen	Fa. DAKO
<u>D</u> eckgläser	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Diamantmesser	DIATOME AG, Biel, Schweiz
<u>O</u> bjektträger	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
<u>P</u> arafilm M	American National Can Company, Baltimore
PC	Siemens AG, Erfurt
Pipetten	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf
<u>R</u> üttler HS 250	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
<u>S</u> ilikonkautschukformen	EMD, Washington/USA
<u>U</u> ltramikrotom (Ultracut S)	Leica GmbH, Wetzlar
<u>V</u> ortex Mixer, variable speed, Stuart SA 8	Barloworld Scientific Ltd., Staffordshire, UK
<u>W</u> ärmeplatte	Medite GmbH, Burgdorf

3.2 Chemikalien

3.2.1 Substanzen

2,4,6- Tris (dimethylamino- methyl)-phenol (DMP 30)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
3-Aminopropyltriethoxysilan (APES)	F.B. Silbermann GmbH & Co KG, Gablingen
3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid	Merck KG aA, Darmstadt
<u>A</u> cton	Roth GmbH & Co.KG Karlsruhe
Acetonitrile	Sigma Aldrich GmbH, München
<u>B</u> enzol	Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
<u>D</u> i-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Dodeceny-Bernsteinsäure- anhydrit (DDSA)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
<u>E</u> ntellan	Merck KG aA, Darmstadt
Epon 812	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol (30%,50%,70%,90%,abs.)	Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
<u>G</u> lukoseoxidase (Typ VII, Aspergillus niger)	Sigma Aldrich GmbH, München
<u>K</u> aliumdihydrogenphosphat	Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

<u>M</u> ethanol	Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Methanol-Benzol	Sigma Aldrich GmbH, München
Methanolisches NaOH	Sigma Aldrich GmbH, München
Methylenblau	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methylnacidanhydrid (MNA)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Moviol	Merck KG aA., Darmstadt
<u>N</u> atriumchlorid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<u>P</u> araformaldehyd (PFA)	Merck KG aA., Darmstadt
Propylenoxid	Sigma Aldrich GmbH, München
<u>S</u> alzsäure (HCl)	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<u>T</u> riethanolamin	Merck KG aA., Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS Base)	Merck KG aA., Darmstadt
<u>W</u> asser (reinst, bidestilliert)	Anatomie II, Jena
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma Aldrich GmbH, München
<u>X</u> ylol	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

3.2.2 Lösungen und Puffer

Kunstharz

- 13 g EPON 812
- 8 g Dodecenyl-Bernsteinsäureanhydrit (DDSA)
- 6 g Methylacidanhydrid (MNA)
- 1,2 g 2,4,6- Tris (dimethylaminomethyl)-phenol (DMP 30)

Die Mischung wird stets frisch zubereitet.

JenChromPx (Visualisierung der Immunmarkierung; JenLab, Jena, Germany)

- Tris- (hydroxy methyl)- aminomethan (180 mg)
- Diaminobenzidin (12 mg)
- Nickel-2-Sulfat (300 mg)
- Glukose (60 mg)
- Glukoseoxidase (0,001% → 40 ml)

Die Substanzen werden in Aqua bidest angelöst. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan wird dem angelösten Nickel-2-Sulfat zugefügt. Das gelöste Diaminobenzidin und anschliessend die gelöste Glukose wird hinzugegeben. Die Lösung wird in einer Küvette auf 80 ml mit Aqua bidest aufgefüllt. Abschliessend wird die Glukoseoxidase hinzugefügt, Die Objektträger sind sofort in die Küvette zu geben und 15 Minuten in der Lösung zu belassen.

Lösung zur Blockade der endogenen Peroxidase

- Methanol (10 ml)
- 30% H₂O₂ (10 ml)
- PBS (80 ml)

Die Lösung zur Blockade der endogenen Peroxidase wird kurz vor dem Gebrauch gemischt.

PBS

- Kaliumdihydrogenphosphat (9,0 g)
- Di – Natriumhydrogenphosphat – Dihydrat (46,6 g)
- Natriumchlorid (45,0 g)

Auffüllen mit 5 Litern aqua bidest. Die Lösung wird bis zum Lösen der Salze mindestens eine Stunde auf einem Magnetrührer gemischt.

Perfusionslösung Formaldehyd (4%) in PBS

- Paraformaldehyd
- PBS (10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 + 0,9% NaCl)

10x TBS

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (12,114 g)
- Natriumchlorid (25,2 g)

Die Lösung wird in 150 ml aqua dest mit HCl (pH senken) bzw NaOH (pH erhöhen) auf einen pH-Wert von 7,2 – 7,4 eingestellt. Anschliessend wird die Lösung auf 200 ml mit aqua dest aufgefüllt.

1x TBS Gebrauchslösung

- 100 ml 10x TBS
- 900 ml Wasser_{reinst}

3.2.3 Antikörper

	Antikörper	Katalognummer	Host	Verdünnung	Hersteller
Primär-antikörper	CBG		Rabbit	1:250	Affiland S.A., Ans-Liege, Belgien
Sekundär-antikörper	Anti-Rabbit-IgG	A-6154	Goat	1:100	Sigma Aldrich GmbH, München
Tertiär-antikörper	PAP	P-2026	Rabbit	1:100	Sigma Aldrich GmbH, München

3.3 Untersuchungsmaterial

Für die Gewinnung von Material und die Untersuchungen wurden Ratten vom Stamm Wistar eingesetzt (Fa. Charles River). Die Tierversuche wurden durch das Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt und unter dem Versuchsprotokoll 02-040/10 geführt. Für die Untersuchungen wurden drei Würfe zu je 12 Tieren verwendet. Es handelte sich dabei um Jungtiere in unterschiedlichen Entwicklungsstufen, vom ersten bis 32. Postnataltag. Eine Unterscheidung nach Geschlecht der Jungtiere war bei den neugeborenen Tieren nicht möglich.

3.4 Töten der Versuchstiere

Um eine Gewebepräparation durchführen zu können, mussten die Jungtiere vorher getötet werden. Dazu wurden die Tiere unmittelbar nach der Geburt, bzw. in den gewünschten Entwicklungsstufen bis 32 Tage nach der Geburt aus dem Wurf entnommen. Die Tötung erfolgte über ein mit Diethylether getränktes Zellstoff am Boden eines Glasgefäßes. Die Ratte verbleibt in dem Glasgefäß, bis der Tod eingetreten ist.

3.5 Gewebepräparation

Nach dem Tod der Ratte erfolgte die Eröffnung des Thorax mittels einer Schere. Eine Kanüle wurde in den linken Herzventrikel eingeführt und mit einer Gefäßklemme fixiert. Das rechte Atrium wurde aufgeschnitten. Die Perfusion des Gefäßsystems erfolgte durch die Kanüle mit 4% Paraformaldehyd in PBS (10 mM PBS, pH 7,4, 5% Sucrose) mit einem Volumen von etwa dem Doppelten des Körpergewichtes der Ratte. Die Perfusion dauerte so lange an, bis aus dem eröffneten rechten Atrium klare Flüssigkeit austrat. Nach der Perfusionsfixierung wurden die Ratten dekapitiert und die Schädelkalotte mit einer Pinzettenschere entfernt. Bei den neugeborenen Ratten ist das Gehirn in seiner Konsistenz noch sehr weich, daher wurde eine Immersionsfixierung mit 4% Paraformaldehyd in PBS (10 mM PBS, pH 7,4, 5% Sucrose) über zwei Tage im Kühlschrank durchgeführt.

3.6 histologische Aufarbeitung

Die Kleinhirne wurden von den Gehirnen abpräpariert, indem die Kleinhirnstiele durchtrennt wurden. Bis zum 5. postnatalen Tag ist dies aufgrund der geringen Größe nicht möglich; vor dem 5. Postnataltag wurde das gesamte Rhombenzephalon entfernt. Die Kleinhirnpräparation wurde von der Kaudalseite begonnen.

3.7 Beschichtung der Objektträger mit APES

Die Beschichtung der Objektträger (OT) mit 3-Aminopropyltriethoxysilane bewirkt eine verbesserte Haftung der Schnitte auf dem OT. Dazu wurde 4 ml 2%iges APES auf 200 ml Aceton aufgefüllt und die Objektträger fünf Minuten eingetaucht. Anschließend werden diese weitere fünf Minuten in 2%iges APES getaucht und danach mehrfach mit Aqua dest gespült.

3.8 Kunstharzeinbettung

Die Gewebelöcke der perfundierten Präparate wurden kleingeschnitten, so dass das Spino- und Pontocerebellum, sowie die Hemisphären getroffen waren, mit einer Kantenlänge von maximal 8 mm. Anschließend wurden die Präparate in PBS gewaschen und der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wie folgt zugeführt: zwei Stunden in 30% Ethanol, zwei Stunden in 50% Ethanol, zwei Stunden in 70% Ethanol, zwei Stunden in 90% Ethanol und abschließend 3x zwei Stunden in absolutem Alkohol. Die Blöcke wurden dann in ein Intermedium (Propylenoxid) gegeben und das Kunstharz wurde vorgemischt (13 g EPON 812, 8 g DDSA, 6 g MNA, 1,2 g DMP 30). Das vorgemischte Kunstharz wurde anschließend im Verhältnis 1:5 mit Propylenoxid gemischt, die Gewebestücke hinzugegeben und über Nacht stehengelassen. Das Propylenoxid verdampft in dieser Zeit. Blockformen aus Silikonkautschuk wurden mit frisch gemischtem Kunstharz gefüllt und die Gewebestücke wurden darin überführt und positioniert. Die gefüllten Blockformen blieben anschließend etwa zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen und wurden dann drei Tage bei 60°C im Wärmeschränk auspolymerisiert und aus den Silikonkautschuk-Formen genommen. Das Gewebe im Kunstharz-Block wurde soweit mit einer Feile getrimmt, bis eine ausreichende Anschnittfläche für die Bearbeitung mit dem Ultramikrotom zu sehen war.



Abb. 04: EPON 812-Blöcke mit Anschnitt des Gewebes

3.9 Herstellung von Semidünnschnitten

Die angefeilten Kunstharz-Blöcke wurden im Ultramikrotom Reichert Ultracut S mithilfe eines 45° Diamantmessers auf eine Dicke von 1 μm geschnitten.



Abb. 05: Ultramikrotom Ultracut S der Firma Leica

Die Schnitte wurden anschließend mittels einer feinen Nadel aus dem mit Aqua tridest-gefüllten Auffangbehälter (aus einer MILLIPOR-Anlage) des Diamantmessers genommen und auf die APES-beschichteten Objektträger gebracht.



Abb. 06: Entnahme der Schnitte zum Transfer auf die OT

Die OT wurden anschließend auf einer Heizplatte bei 60° C getrocknet. Einige Schnitte wurden mit einer 1%igen Methylenblaulösung eine Minute gefärbt, um den Zustand des Gewebes beurteilen zu können. Gleichzeitig wurden alle Schnitte beschriftet, um diese eindeutig zuordnen zu können.

3.10 Entharzen der Schnitte

Zunächst wurden die Schnitte jeweils zwei Minuten einer Chemikalienreihe in folgender Reihenfolge zugeführt: methanolisches NaOH, Methanol/ Benzol und 2x in Aceton je 2 Minuten bei RT. Das Entharzen der Schnitte war nötig, um sie immunhistochemisch anfärben zu können. Anschließend wurden die Schnitte 3x zehn Minuten in PBS (10 mM) gewaschen.

3.11 Immunhistochemische Aufbereitung

Blockade der endogenen Peroxidase

Für die Reduktion von unspezifischen Reaktionen mit anderen Gewebsproteinen wurde die Blockade der endogenen Peroxidase durchgeführt. Dazu wurden 30%iges H_2O_2 mit 10% Methanol und PBS (10 mM PBS, pH 7,4; isoton mit NaCl) in oben

genannten Konzentrationen gemischt und die Schnitte 15 Minuten in der Lösung belassen. Es erfolgte im Anschluss das Waschen der Schnitte mit PBS für 3x zehn Minuten.

Auftragen der Antikörper

Die Schnitte wurden, um ein Austrocknen zu verhindern, in eine feuchte Kammer gelegt und der primäre Antikörper gegen CBG (a-CBG, rabbit) in einer Verdünnung von 1:250 (mit 10 mM PBS, pH 7,4; isoton mit NaCl) mittels einer Pipette aufgetragen. Die feuchten Kammern kamen über Nacht in den Kühlschrank. Anschließend wurden die Objektträger 3x zehn Minuten mit PBS gewaschen. Nun wurde der Sekundär-Antikörper (Anti-rabbit in goat) in einer Verdünnung von 1:100 (mit PBS) mittels Pipette aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden wiederholt 3x zehn Minuten in PBS gewaschen. Der Tertiär-Antikörper (PAP-Komplex in rabbit) wurde mit einer Verdünnung von 1:100 (in PBS) mittels Pipette aufgetragen und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte das Waschen der Objektträger 3x zehn Minuten in PBS und anschließend 3x zehn Minuten in TBS. Inkubationspuffer für primäre, sekundäre und tertiäre Antikörper ist PBS (10 mM, isoton mit NaCl).

JenChromPx- Färbung

Die Substanzen wurden nach dem auf Seite 17 beschriebenen Protokoll gelöst und die Lösung in Küvetten gefüllt. Die Objektträger wurden umgehend in die Lösung gebracht und dort 15 Minuten belassen. Eine Färbung der Schnitte konnte schnell beobachtet werden. Nach dem Färbebad wurden die Objektträger 3x zehn Minuten in TBS gewaschen und weitere zwei Minuten in Aqua bidest gespült.

Entwässerung der gefärbten Schnitte

Die Entwässerung der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Objektträger wurden jeweils drei Minuten in 50%igen, 70%igen, 90%igen und 2x in absoluten Alkohol getaucht und anschließend 2x sechs Minuten in Xylol.

Aufbringen der Deckgläschen

Mittels eines Glasspatels wurde das Eindeckmittel Entellan punktförmig auf den Schnitt aufgebracht und anschließend ein Deckgläschen vorsichtig aufgesetzt. Die fertigen Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.12 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Untersuchungen erfolgte mit dem Fotomikroskop Olympus BX 50, der zugehörigen Kamera Olympus DP 10 und der Software DP Soft.

4 Ergebnisse

Während der Postnatalentwicklung ist die Gliederung des cerebellären Cortex in Stratum moleculare, Stratum pukinjense und Stratum granulosum bereits in den ersten Tagen ansatzweise zu erkennen. Vor allem die zeitlebens zur Proliferation befähigten Körnerzellen sind zahlreich erkennbar. Auffällig war auch eine deutliche CBG-Immunreaktivität der Pia mater.

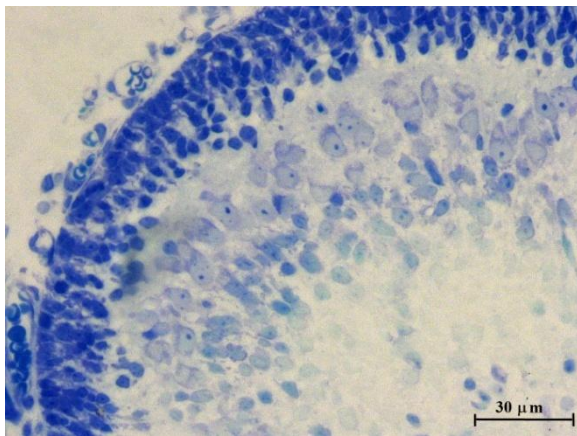


Abb. 07: 3-schichtiger Cortex, 1. PNT, Übersichtsfärbung Methylenblau

In der Molekularschicht konnten am 1. Postnataltag nur wenige Zellen mit CBG-Immunreaktivität gefunden werden (Abb. 08 und 09). In der Übersichtsfärbung (Abb. 07) erschien die Molekularschicht schon sehr zellreich. Das Marklager erschien

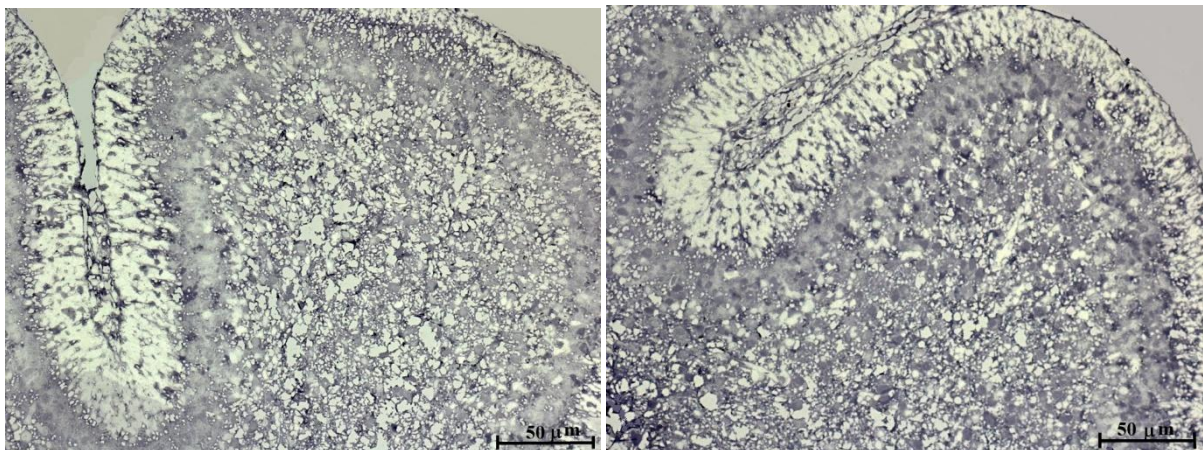


Abb. 08, Abb. 09: Immunreaktivität CBG, 1. PNT, Färbung: JenChromPx

ausgeprägt und faserreich. Es handelt sich hierbei vermutlich um Efferenzen der Purkinjezellen. Vereinzelt waren Interneurone angefärbt. Starke Immunreaktivität für CBG zeigte sich in den Perikarien der Purkinjezellen sowie in den Körnerzellen. In der Purkinjezellschicht konnte eine ausgeprägte cytoplasmatisch lokalisierbare Immunreaktivität für CBG festgestellt werden. An vereinzelt Körnerzellen fand sich eine ausgeprägte CBG-Markierung.

Am 2. Postnataltag (Abb. 10 und 11) war die Färbung der Purkinjezellen deutlich zurückgegangen. Die Purkinjezellschicht erschien unregelmäßig.

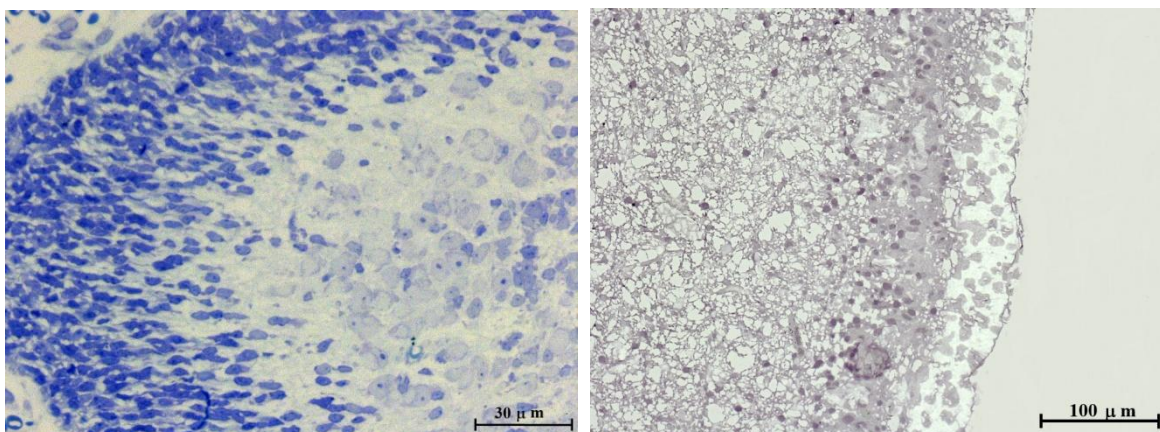


Abb. 10: 2. PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau **Abb.11:** 2. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

Die Anzahl und die Farbeintensität der markierten Körnerzellen im Stratum granulosum waren im Vergleich zum Vortag erhöht. Die meisten Körnerzellen wiesen eine starke CBG-Immunmarkierung auf.

An Tag 3 und 5 der Postnatalentwicklung (Abb. 12 und 13) war die Immunfärbung für CBG in der Körnerzellschicht stark angestiegen. Mindestens die Hälfte der Körnerzellen zeigte sich stark CBG-positiv. Es konnten darüber hinaus auch Interneurone (vermutlich Golgizellen) beobachtet werden. Am 3. Postnataltag waren nur wenige Purkinjezellen mit einer Immunmarkierung zu detektieren.

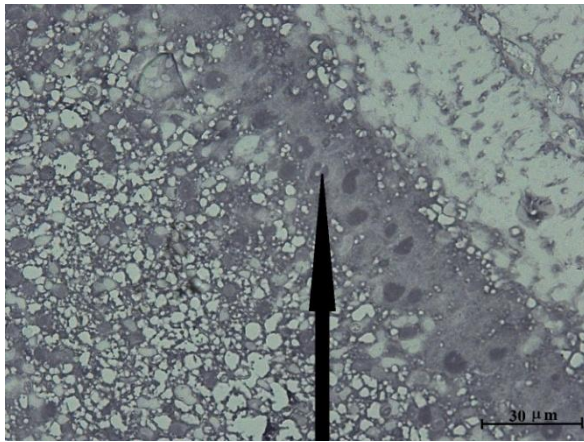


Abb. 12: 5. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

Am 5. Postnataltag (Abb. 12 und 13) konnte eine ausgeprägte CBG-Immunreaktivität in der Purkinjezellschicht festgestellt werden. In den Purkinjezellen selbst erschien CBG unter Aussparung der Nucleoli im Kern lokalisiert zu sein (Abb. 12). Es war auffällig, dass ebenfalls zwischen den Purkinjezellen und auch oberhalb derselben eine ausgeprägte CBG-Immunreaktivität festzustellen war, die sich allerdings nicht von der cytoplasmatischen Lokalisation diskriminieren lässt. Die nucleäre CBG-Lokalisation war an diesem Tag am intensivsten ausgeprägt. Ab diesem Zeitpunkt erschien die Molekularschicht in Hinblick auf die CBG-Expression sehr heterogen. In diesem Zeitraum ließ sich eindeutig feststellen, dass die äußeren Bereiche der Molekularschicht, von einzelnen Zellen einmal abgesehen, generell CBG-negativ waren.

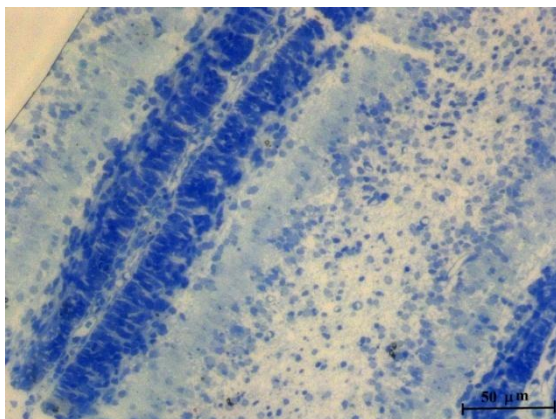


Abb. 13: 5. PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau

Im Zeitraum vom 7. – 9. Postnataltag konnte ein deutlicher Rückgang der CBG Markierung der Körnerzellen festgestellt werden, bei offensichtlich gleichzeitiger Zunahme der Anzahl dieser Zellpopulation (Abb. 14).

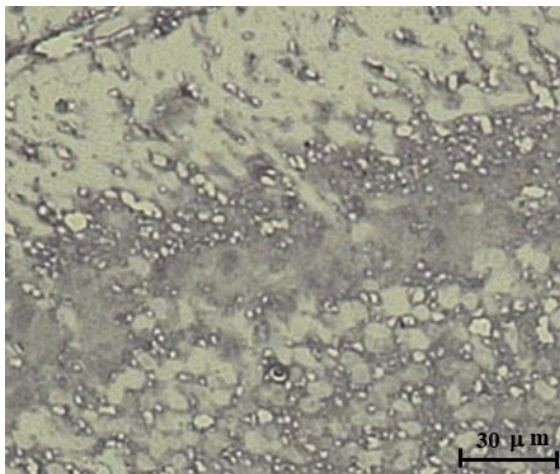


Abb. 14: 7. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

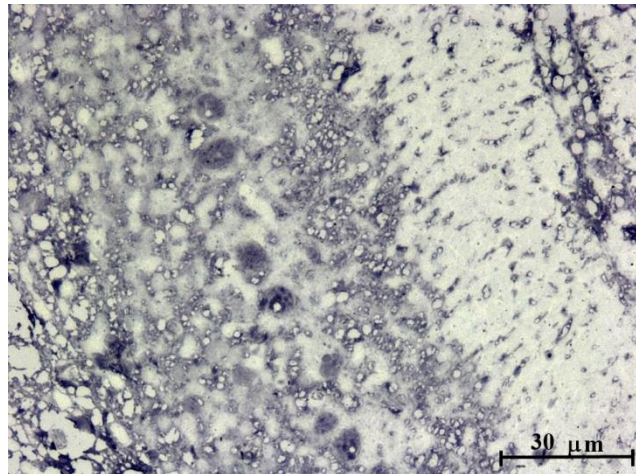


Abb. 15: 9. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

Darüber hinaus erschien die Anzahl CBG-positiver Purkinjezellen deutlich reduziert zu sein, bei gleichzeitiger Reduktion der Lokalisation von CBG auf die Kernregion und möglicherweise auf das perinucleäre Cytoplasma. Im Gegensatz dazu konnte in den Dendritenbäumen der Purkinjezellen keine CBG-Immunreaktion detektiert werden. Interessanterweise konnte im gleichen Zeitfenster auch eine erhöhte Schichtdicke der Molekularschicht beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Körnerzellschicht (Abb. 16), wobei festgestellt werden muss, dass nur eine kleine Subpopulation von Körnerzellen eine intensive CBG-Markierung aufwiesen.

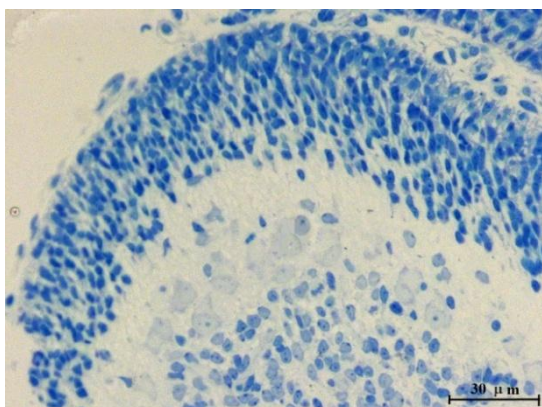


Abb. 16: 7. PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau

Die Anzahl der Körnerzellen erhöhte sich am 11. Postnaltag weiter, die Anzahl der stark CBG-gefärbten Körnerzellen hingegen sank weiterhin (Abb. 18). In den ersten beiden Wochen der Postnatalentwicklung war eine kontinuierliche Zunahme der Körnerzellanzahl zu beobachten (Abb. 17).

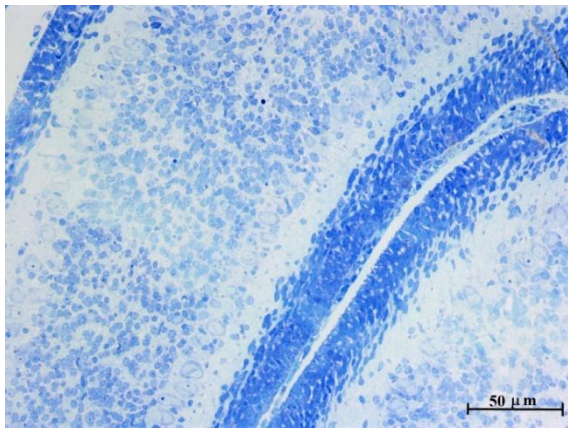


Abb. 17: 11. PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau

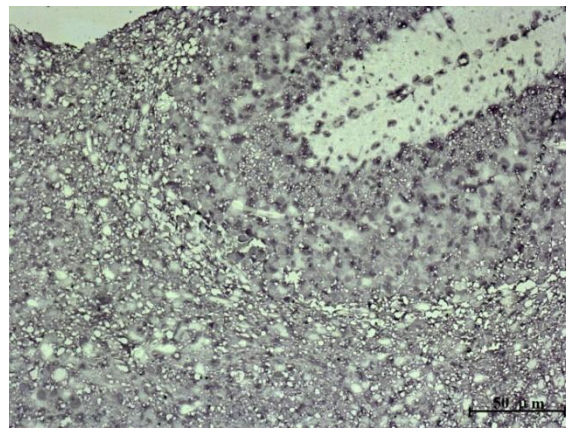


Abb. 18: 11. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

In der Molekularschicht konnte entweder keine oder nur eine punktuell beschränkte CBG-Immunmarkierung detektiert werden.

Am 13. Postnaltag fiel über weite Areale der Körnerschicht die CBG-Immunreaktion negativ aus. Allerdings konnten einzelne CBG-positive Purkinjezellen in einer Art zufälligen Verteilung beobachtet werden. In diesen Fällen blieb CBG auf den Kern und eventuell auf die perinucleäre Region beschränkt. Weiterhin wies das äußere Drittel der Molekularschicht, von einzelnen zellulären Lokalisationen abgesehen, keine CBG-Markierung auf (Abb. 19).

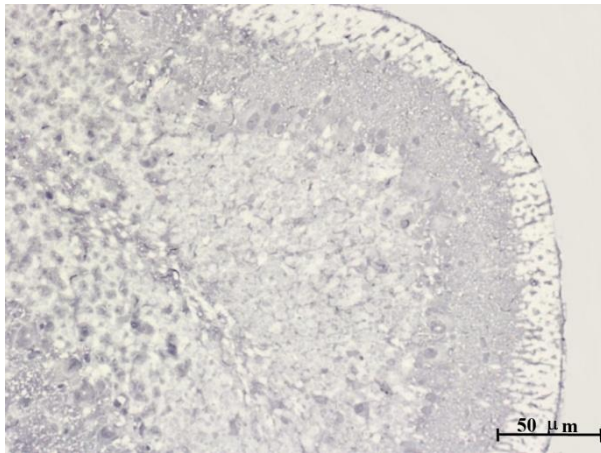


Abb. 19: 13. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

Ab dem 14. Postnaltag war eine Zunahme der Dendritenfärbung zu verzeichnen. Die Anzahl der immunreaktiven Purkinjezellen stieg etwas an. Vereinzelt zeigten sich noch Körnerzellen CBG-positiv. Morphologisch war der dreischichtige Cortex vollständig ausgeprägt. Die Purkinjezellen stellten sich in der Purkinjezellschicht in regelmäßiger Anordnung dar und deren Dendriten ragten in die Molekularschicht (Abb. 20 und 22). Eine große Anzahl an Körnerzellen war über dem Marklager erkennbar (Abb. 20). Es bestand eine Diskrepanz zwischen dem Zellreichtum (Abb. 20) und der Häufigkeit der CBG-Markierung (Abb. 21) bis zum 16. Postnaltag (Abb. 23).

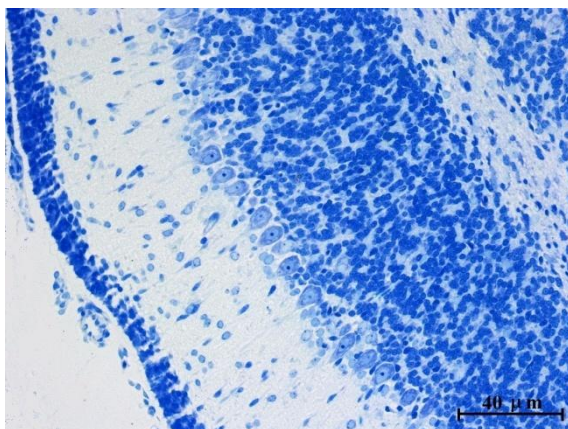


Abb. 20: 14. PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau

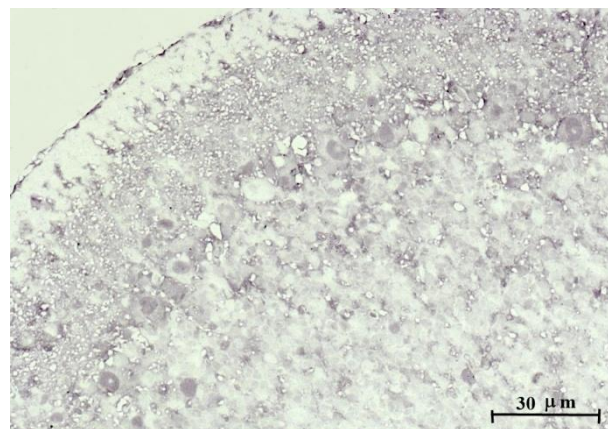


Abb. 21: 14. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

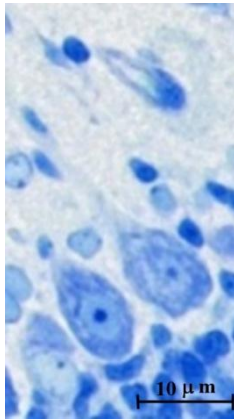


Abb. 22: vergrößerter Bildausschnitt aus Abb. 20

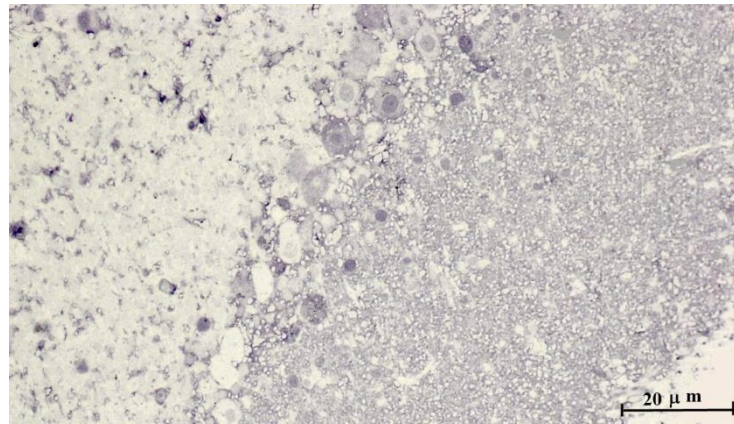


Abb. 23: 16. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

Im Zeitraum vom 18. bis 28. Postnataltag (Abb. 24 – 31) konnten lokal begrenzte Populationen von Purkinjezellen mit einer eindeutigen CBG-Immunmarkierung detektiert werden, die am 22. Postnataltag offensichtlich kumulierte (Abb. 28). Eine gewisse Subpopulation von Purkinjezellen wies allerdings keinerlei CBG-Immunreaktion auf. Diese Tendenz zeigte sich nur temporär, dass heißt ab dem 24. Postnataltag war ein deutlicher Rückgang zu verzeichnen (Abb. 29). CBG war in diesem Zeitfenster besonders am 22. Postnataltag sowohl cytoplasmatisch als auch nucleär lokalisiert (Abb. 28). Die Molekularschicht war in endgültig ausgeprägter Schichtdicke zu sehen (Abb. 24 und 25). Darüber hinaus zeigte die gesamte Molekularschicht ab dem 18. Postnataltag eine durchgängig homogene und positive CBG-Immunmarkierung (Abb. 26 – 31). Darin konnten ebenfalls CBG-positive Interneurone (Korb- und Sternzellen) detektiert werden. Die Körnerzellschicht wies nur eine schwache Immunmarkierung auf, die sich offensichtlich auf die Interneurone beschränkte.

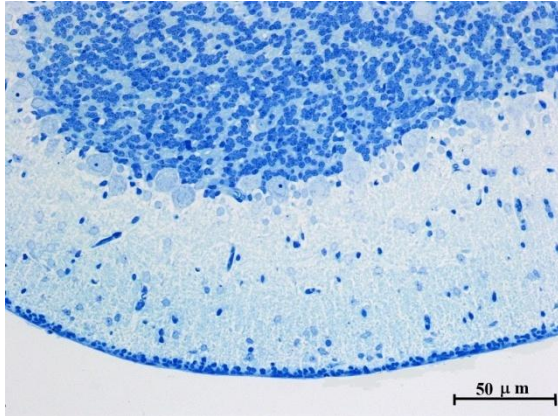


Abb. 24: 18. PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau

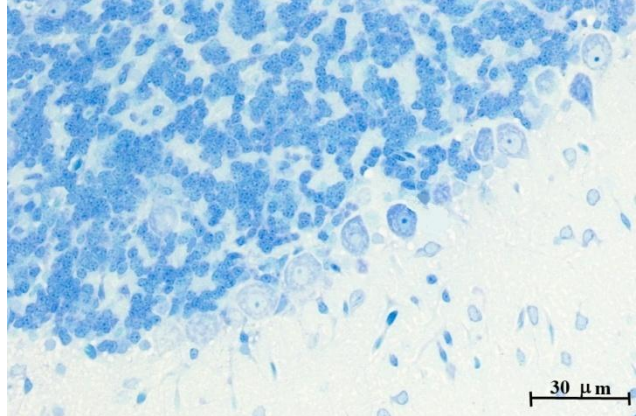


Abb. 25: 22. PNT, Übersichtsaufnahme Methylenblau

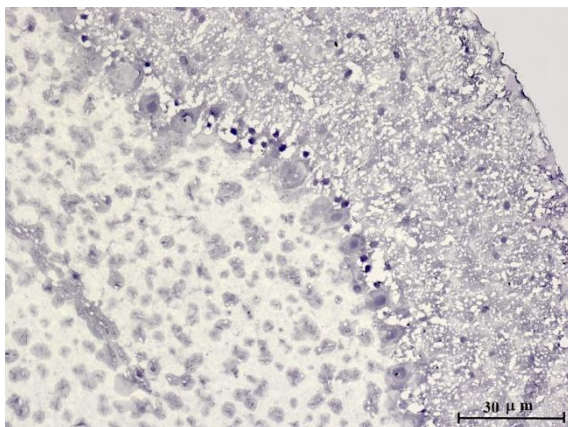


Abb. 26: 18. PNT, CBG, Färbung JenChromPx

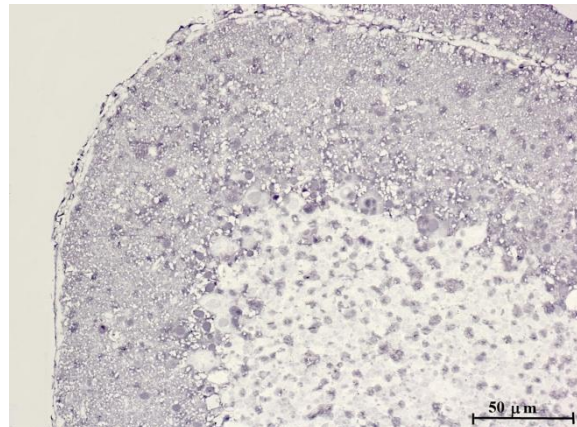


Abb. 27: 20. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

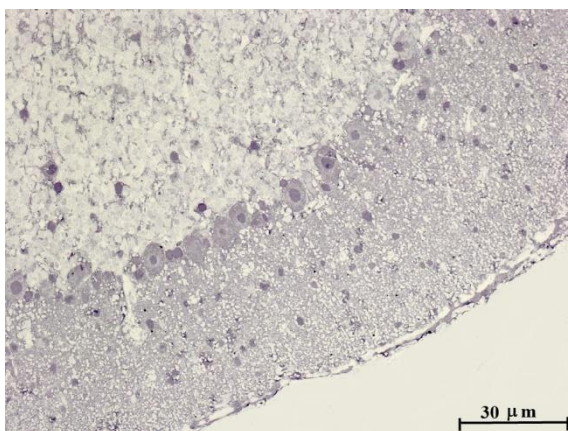


Abb. 28: 22. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

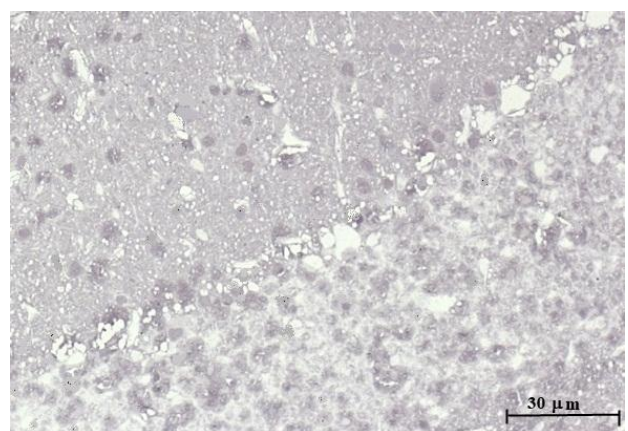
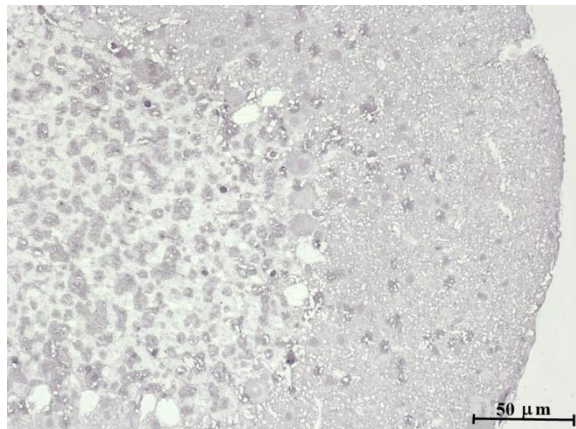
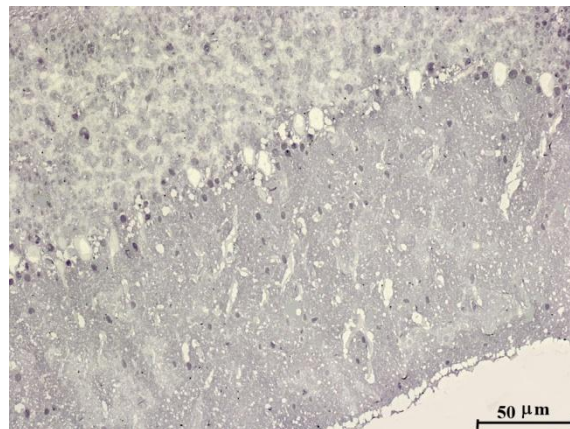
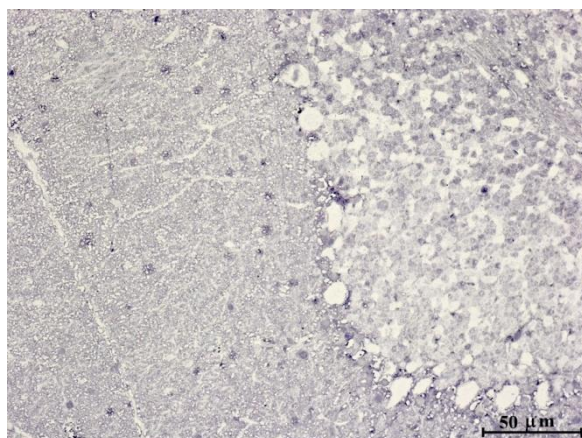
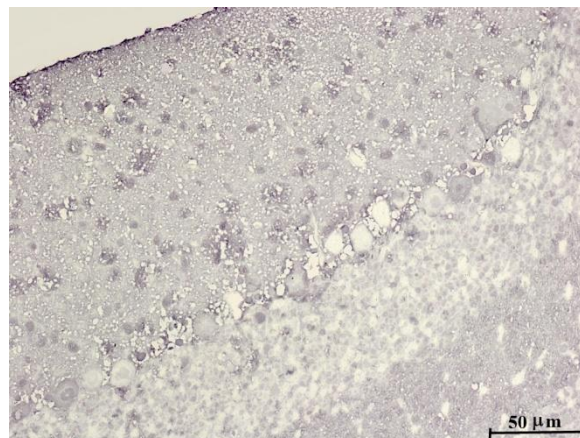


Abb. 29: 24. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

**Abb. 30:** 26. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx**Abb. 31:** 28. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

Ab dem 30. Postnaltag waren die Purkinjezellen cytoplasmatisch und nucleär fast überall frei von CBG. Allerdings konnte in unmittelbarer Nachbarschaft der Purkinjezellen punktuell konzentriert CBG-Immunreaktivität detektiert werden. Die Molekularschicht wies eine homogene Verteilung von CBG auf, wobei die Dendritenbäume offensichtlich negativ blieben (Abb. 32). In der Molekularschicht selbst konnte weiterhin eine gleichmäßige Verteilung CBG-positiver Interneurone beobachtet werden (Abb. 33). Andererseits schienen die meisten Körnerzellen keine CBG-Immunreaktivität aufzuweisen. Im Gegensatz dazu fielen die Bereiche zwischen den Körnerzellen durch eine positive CBG-Markierung auf. Eine Aufstellung der CBG-Markierung zeigt Tabelle 01 (Tab. 01).

**Abb. 32:** 30. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx**Abb. 33:** 32. PNT, CBG, Färbung: JenChromPx

Tag (postnatal)	Purkinjezellen	Körnerzellen	Dendriten	Nicht-Purkinjezellen
1	++++	+	-	+
2	++	++	-	+
3	+	++++	-	+
5	++	++++	-	+
7	+	+	-	+
9	+	+	-	+
11	+	+	-	+
13	+	-	-	+
14	+	+	+	+
16	+	-	+	+
18	+	-	+	+
20	+	-	-	+
22	++	-	-	+
24	-	-	-	+
26	-	-	-	+
28	-	-	-	+
30	-	-	-	-
32	-	-	-	-

Tab. 01: Verteilung der Immunreaktivität für CBG

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig die möglichen Veränderungen der Verteilung des Steroidbindungsglobulins CBG während der Postnatalentwicklung im Cerebellum, insbesondere im cerebellären Cortex der Ratte. Die Untersuchungen beschreiben die Veränderungen qualitativ.

Möpert et al. (2006) untersuchten die Präsenz von CBG im Gehirn, insbesondere im Hypothalamus der Ratte. Sie zeigten bereits, dass einzelne Purkinjezellen im adulten Rattenkleinhirn CBG enthalten. Die Verteilung des CBG ist ähnlich der des SHBG (Herbert et al., 2003, Herbert et al., 2003), welches zusammen mit dem Neuropeptid Oxytocin in den paraventriculären und supraoptischen Kernen gefunden wurden. Es gibt einige interessante Diskrepanzen zwischen der SHBG- und CBG- Verteilung im Gehirn. Zum Beispiel ist CBG im Nucleus suprachiasmaticus gefunden worden, während SHBG nur im hinteren Bereich dieses zirkadianen Rhythmus-Kontrollbereiches entdeckt wurde. Sivukhina et al. (2006) konnten CBG erstmals im menschlichen Hypothalamus auf zellulärer Ebene nachweisen.

Offenbar ist CBG während der Entwicklung unterschiedlich verteilt. Die Gliederung des cerebellären Cortex ist bereits am Anfang der postnatalen Entwicklung deutlich zu erkennen.

Bereits am 1. Postnataltag zeigten sich zahlreiche Purkinjezellen CBG-positiv. Die Purkinjezellen werden vor den Körnerzellen gebildet und fungieren als einziges efferentes System (Schmidt et al., 2010; Schiebler und Korf, 2007). Das Marklager stellte sich faserreich dar; vermutlich handelt es sich dabei um Efferenzen der Purkinjezellen. Wir verwendeten bei unseren Untersuchungen keine spezifischen Marker für Purkinjezellen. Die Immunreaktion in der Körnerzellschicht stellt sich relativ diffus dar. Auffällig war auch eine deutliche Immunreaktivität der Pia mater. Dieses Resultat lässt sich durch hohe extrinsische CBG Level im Liquor cerebrospinalis erklären. Unmittelbar nach der Geburt ist ein hoher Steroidspiegel aus dem mütterlichen Blut zu verzeichnen. Zamudio-Bulcock et al. (2011) wiesen in ihren Studien die reichliche Expression von TRPM3 steroid-sensitiven Kanälen im sich entwickelnden Kleinhirn, sowie TRPM3-ähnliche Kanäle in den glutamatergen Synapsen der

neonatalen Purkinjezellen nach. Diese könnten als Modulatoren der glutamatergen Übermittlung im sich entwickelnden Gehirn wirken. TRPM3 dienen als Kationen-selektive Kanäle der zellulären Calcium-Signaltransduktion und Homöostase (Clapham et al., 2005).

Das Kleinhirn ist ein wichtiges Organ für die Kontrolle von Willkürmotorik und wird stark von Steroidhormonen beeinflusst. Die klassische Wirkungsweise von Steroiden über den bekannten Kernrezeptor, der als Transkriptionsfaktor im Gehirn wirkt, ist bis jetzt noch nicht im Kleinhirn publiziert worden, da nucleäre Steroidrezeptoren noch nicht nachgewiesen werden konnten. Allerdings beschrieben Caldwell und Jirikowski (2013) an HT22 fetalen Hippocampuszellen bereits mögliche Transportwege von Steroiden unter Vermittlung von CBG in die Umgebung des Zellkerns oder in den Zellkern direkt.

Die Immunreaktivität für CBG ist in den Purkinjezellen am 2. Postnataltag deutlich zurückgegangen. Im Gegensatz dazu zeigt sich die Anzahl der markierten Körnerzellen erhöht. Die Körnerzellen bilden Synapsen mit den Moosfasern aus dem Tractus spinocerebellaris und dem Tractus frontopontinus.

Die Immunfärbung der Körnerzellen steigt an den untersuchten Postnataltagen 3 und 5 weiter an, korrelierend mit der Anzahl der Körnerzellen. Dies entspricht der erweiterten motorischen Entwicklung, die die Jungtiere in dieser Zeit durchleben. Die Purkinjezellschicht erscheint zu diesem Zeitpunkt regelmäßiger. Die Veränderungen in der Altersentwicklung korrelieren zeitversetzt mit Veränderungen der Steroidspiegel. Umwelteinflüsse wie Stress, hormonaktive Stoffe und Unterernährung wirken auf die normale Gehirnentwicklung. Im adulten Gehirn ist die strukturelle Neuroplastizität beteiligt an der funktionellen Adaptation der wechselnden inneren und äußeren Umwelteinflüsse. Zahlreiche Hormonrezeptoren werden im Kleinhirn exprimiert und die Kleinhirnfunktionen werden über verschiedene Hormone gesteuert (Koibuchi, 2008). Die Neurogenese von Säugetieren ist zum Zeitpunkt der Geburt ausgedehnt, verlangsamt sich und kommt beim Menschen während des Alterungsprozesses nur noch eingeschränkt im Kleinhirn und Hippocampus vor. Es gibt Hinweise dafür, dass alternde Purkinjezellen von zirkulierenden Sexualhormonen am Leben erhalten werden, eher als von lokalen Neurosteroiden (Janmaat et al., 2011). Der altersbedingte Tod der Purkinjezellen ist also steroidabhängig (Biamonte et al., 2009). Untersuchungen zeigten, dass die Exposition

von Glucocorticoiden die Neurogenese bei Erwachsenen und Kindern erheblich beeinträchtigen kann. Es ist bekannt, dass Glucocorticoide mit einer hohen Affinität an intrazelluläre Rezeptoren binden können. An der Zellmembran gibt es mit hoher Wahrscheinlichkeit Rezeptoren für die Bindungsglobuline (Rosner et al., 1988), da diese die Zellmembran, außer durch Exo- und Endozytose, nicht durchdringen können. Rune und Frotscher wiesen 2005 erstmalig nach, dass Estradiol de novo in hippocampalen Neuronen synthetisiert wird und dass dieses essentiell für die synaptische Plastizität ist (Rune und Frotscher, 2005). Die Reduktion der hippocampalen Estradiol-Synthese mittels Letrozol, einem reversiblen nonsteroidalen Aromatase-Inhibitor, führte zu einer dosisabhängigen Abnahme des 17beta-Estradiols, begleitet von einer signifikanten Abnahme der Dichte von spinalen Synapsen und der Anzahl von präsynaptischen Boutons (Kretz et al., 2004).

Normalerweise wird der Glucocorticoid-Plasmaspiegel von Stressfaktoren aus der Umwelt über die HPA-Achse reguliert, aber auf Grund ihrer klinischen Bedeutung werden diese auch in Medikamentenform verabreicht. Wang et al. (2011) zeigten in ihren Untersuchungen, dass die Verabreichung typischer Glucocorticoid-Agonisten wie Dexamethason in der Lage sind, das Stammzellwachstum zu stimulieren und somit die Neurogenese zu erhöhen. Diese Aussage steht auch in Übereinstimmung mit der beobachteten CBG-Immunreaktivität der Purkinjezellen. Die hier beobachtete nucleäre CBG-Lokalisation könnte durchaus ein Hinweis auf den Transport von Glucocorticoiden zum Zellkern sein. Auffällig ist, dass nucleäre CBG-Lokalisationen der Purkinjezellschichten nur im Zeitraum kritischer stressbelasteter Postnataltage festzustellen waren. Dies steht zunächst im Gegensatz zu früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Hepatocyten von Perrot-Applanat et al. (1981), die klar ausführten, dass CBG im rauen, endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Allerdings konnte gelegentlich CBG auch sehr kernnah (perinucleäre Cisterne) detektiert werden. Pusch et al. (2009) beschrieben ebenfalls eine klare cytoplasmatische Lokalisation von CBG an humanen Astrozytomzelllinien. Dabei konnte keine Kolokalisation zwischen CBG (cytoplasmatisch lokalisiert) und dem Glukokortikoidrezeptor (nucleär lokalisiert) beobachtet werden. Andererseits hoben Caldwell und Jirikowski (2013) hervor, dass durchaus steroidbindende Proteine (SHBG) und Steroidrezeptoren (ER β) auch im Zellkern detektiert werden

konnten. Allerdings waren SHBG und ER β niemals gleichzeitig in einer Zelle nucleär lokalisiert. Man kann daraus schließen, dass zwei unabhängige intrazelluläre Transportmechanismen für Steroide existieren. Demzufolge können Zellen Steroide über einen klassischen Glucocorticoidrezeptor (GR) in den Kern transportieren. Andererseits bestehen auch Möglichkeiten des Transportes von Glucocorticoiden zum Zellkern über steroidbindende Globuline, was durch Untersuchungen von Caldwell und Jirikowski (2013) am N. paraventricularis der Maus beschrieben wurde (cytoplasmatische und nucleäre Lokalisation von SHBG). Das steht im Einklang mit den vorliegenden Befunden der cytoplasmatischen und nucleären CBG-Lokalisation der Purkinjezellen. Auffällig ist, dass nucleäre CBG-Lokalisationen nur im Bereich kritischer Postnataltage auftraten. Darüber hinaus waren sie immer mit einer cytoplasmatischen Lokalisation verknüpft und traten niemals isoliert auf. Daraus kann geschlossen werden, dass intrazelluläre Transporte von Glucocorticoiden zum Zellkern unter Vermittlung von CBG nur in besonders stressbelasteten Situationen stattfinden. Demzufolge erscheint der Transport über CBG der effektivere und schnellere zu sein. Das gilt für den Zeitraum um den 5. Postnataltag (kurz vor der Augenöffnung) und noch im stärkeren Maße um den 20.-22. Postnataltag (Verlassen des Nestes). In beiden Fällen ist die sehr ausgeprägte nucleäre und cytoplasmatische CBG-Immunmarkierung der Purkinjezellen mit einer signifikanten CBG-Beladung der Molekularschicht verbunden. Diese muss eindeutig auf die Entwicklung des Moosfaser- und des Kletterfasersystems zurückgeführt werden. Man kann, wie schon früher erwähnt, schließen, dass CBG nicht nur als Transporter für Glucocorticoide in Richtung Zellkern dient, sondern auch zu hohe Mengen an Glucocorticoiden, die in solchen kritischen Postnataltagabschnitten zu erwarten wären, gewissermaßen puffert (Verhinderung der Apoptose von Purkinjezellen oder deren Progenitorzellen). Darüber hinaus lässt sich auch postulieren, dass CBG vielleicht auch trophische Funktionen erfüllt. Im Zeitraum kritischer Postnataltage (7. und 20. Postnataltag) kommt es zu einer nachfolgenden deutlichen Umgestaltung der Molekularschicht (Verbreiterung und zunehmende CBG-Markierung), welche immer mit einer eindeutigen nucleär-cytoplasmatischen CBG-Markierung der Purkinjezellschicht verbunden ist. Im Gegensatz dazu konnten am 30. Postnataltag (Erlangung der Geschlechtsreife, Vertreibung des Jungtieres) lediglich weniger gravierende Veränderungen in den drei Schichten der Kleinhirnrinde detektiert werden. Lediglich auffällig

war eine punktuelle CBG-Markierung am Perikaryon der Purkinjezellen, wogegen deren Dendritenbäume negativ blieben. Eine mögliche Ursache könnte in der finalen Ausprägung des Kletterfasersystems liegen (Einstellung der Erregungsbereitschaft der Purkinjezellen). Offensichtlich stellt die Vertreibung des Jungtieres einen abermaligen sehr stressbeladenen Lebensabschnitt dar, der von hohen Glucocorticoidspiegeln und damit einer entsprechenden CBG-Expression begleitet wird. Man kann daraus folgern, dass sehr lokal begrenzte CBG-Spiegel für eine endgültige Synaptogenese essentiell sind.

Die Anzahl der Körnerzellen steigt in den ersten beiden Entwicklungswochen kontinuierlich an, jedoch zeigt sich die Immunreaktivität für CBG deutlich rückläufig. Bereits am 13. Postnataltag war die Immunfärbung der Körnerzellen praktisch verschwunden. Widrige Umstände in der frühesten Entwicklungsphase beeinträchtigen das Lernen und Gedächtnis beim Erwachsenen. Wilber und Wellman (2009) zeigten in einer Studie an Ratten, dass die Trennung der Jungtiere von der Mutter geschlechtsabhängig den Lidschlag bei den später erwachsenen Tieren beeinträchtigte. Diese Entwicklung korrelierte mit einer Zunahme der Glucocorticoid-Rezeptor Exposition im posterioren Bereich des cerebellären Nucleus interpositus, einer Schlüsselstruktur des neuralen Kontrollkreislafs für den Lidschlag. Die Separation der neugeborenen Tiere milderte zudem die normale Gewichtsabnahme in der dritten Postnatalwoche bei den männlichen Tieren, was auf die signifikant höhere Expression von Glucocorticoid-Rezeptoren im Nucleus interpositus zurückgeführt wurde. Bei den weiblichen Tieren konnte zudem keine Veränderung der Glucocorticoid-Rezeptoren verzeichnet werden (Wilber und Wellman, 2009). Die Untersuchungen stimmen mit ähnlichen Studien überein, die gezeigt haben, dass separationsbedingte Defizite beim räumlichen Lernen und Gedächtnis, sowie der Zurückhaltung durch konditionierte Furcht resultieren können (Meerlo et al., 1999; Huot et al., 2002; Pryce et al., 2003; Kosten et al., 2005, 2006; Uysal et al., 2005; Cannizzaro et al., 2006). Llorente et al. (2009) stellten bei ihren Untersuchungen geschlechtsabhängige Effekte, ausgelöst durch einen frühen Entzug der Mutter, an sich entwickelnden hippocampalen und cerebellären Zellen fest. Sie wählten bewusst diese Regionen, da diese eine hohe Anzahl an Glucocorticoid-Rezeptoren zeigen. Abel et al. (2011) wiesen als erste Forschergruppe nach, dass die Gene der Geschlechtschromosomen die treibende Kraft bei der Entwicklung von Geschlechtsunterschieden im Cerebellum und im frontalen Kortex sind, welche an vielen

normalen Funktionen und neurologischen Erkrankungen beteiligt sind. Die Herunterregulierung der mRNA von Glucocorticoid-Rezeptoren im Gehirn der Ratte kann um einige Zeit länger anhalten als der ursächliche Stimulus, unabhängig von einem neuen Stimulus (Kitraki et al., 1999). Es wird vermutet, dass CBG die endokrine und neuronale Stressantwort, inklusive der Entwicklung von Schmerz- und Ermüdungssyndromen beeinflusst (Cizza et al., 2011). Untersuchungen wiesen darauf hin, dass Glucocorticoid-Rezeptoren in den verschiedenen Zellen des ZNS durch Phosphatase 5, einem wichtigen Enzym für die Signalweiterleitung, unterschiedlich reguliert werden. Die Co-Lokalisation von Phosphatase 5 und Glucocorticoid-Rezeptoren in Gehirnregionen, die der Rückkopplungskontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse unterworfen sind, könnten wichtige Modulatoren von Reaktionen des Glucocorticoid-Rezeptors sein (Rossie et al., 2006). Das Vorkommen von Phosphatase 5 steht vermutlich im Zusammenhang mit der Verteilung von Neuronen, welche Glucocorticoidrezeptoren enthalten (Ahima und Harlan, 1990; Bahl et al., 2001; Cintra et al., 1994; Fuxe et al., 1985; McGimsey et al., 1991; Morimoto et al., 1996).

Die akute Glucocorticoidgabe, wie sie zur Behandlung einer respiratorischen Dysfunktion bei Frühgeborenen eingesetzt wird, in klinisch relevanten Dosen, verursacht die Apoptose von neuronalen Progenitorzellen in der äußeren Körnerzellschicht am sich entwickelnden Kleinhirn der Maus, sowie eine Abnahme der Anzahl cerebellärer Neurone. Die äußere Körnerzellschicht zeigt nach der Geburt eine abnehmende Proliferation und verschwindet während den ersten beiden Lebenswochen. Untersuchungen mit Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten zeigten, dass diese zu einer Abnahme der Apoptose derselben Progenitorzellen führen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die endogene Glucocorticoid-Stimulation die Apoptose in der externen Körnerzellschicht reguliert (Noguchi et al., 2011). Die akute Gabe von Glucocorticoiden bei Neugeborenen führt zu einem selektiven und schnellen apoptotischen Tod von cerebellären neuralen Progenitor-Zellen (Noguchi et al., 2008). Melatonin wirkt ebenfalls indirekt auf die Kleinhirnentwicklung. Es reguliert die Expression von Glucocorticoid-Rezeptoren in den cerebellären Körnerzellen, was wiederum mit einer Abnahme des programmierten Zelltodes von Körnerzellen einhergeht. Desweiteren erhöht Melatonin die Expression von p130, welches ein essentieller Faktor für die Initiation und Erhaltung der neuronalen Entwicklung und Differenzierung ist (Persengiev, 2001).

Eine Zunahme der Dendritenfärbung war ab dem 14. Postnataltag zu verzeichnen. Der dreischichtige Cortex ist in diesem Alter regelmäßig und vollständig ausgeprägt. Das präzise Wachstum und die Verzweigung der Dendriten ist entscheidend für ihre Funktion als Integrator von Signalen, welche aus den Axonen übertragen werden und darüber hinaus für die Funktion des Gehirns. Die korrekte Differenzierung der Dendriten ist besonders wichtig für die Purkinjezellen, ebenso für ihre intrinsische Aktivität, welche von funktionell verschiedenen Regionen des Dendritenbaumes gesteuert werden. Einen trophischen Modulator der Dendritenentwicklung stellt der Corticotropin Releasing Factor (CRF) dar (Swinny et al., 2004). CRF ist ein Peptidhormon, welches im Nucleus paraventricularis und im Hypothalamus gebildet wird. Es stimuliert die Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) und wird von negativen Rückkopplungsmechanismen durch Glucocorticoide beeinflusst. King und Bishop (2002) bestimmten die zelluläre und subzelluläre Verteilung des CRF-Typ-I Rezeptors während der postnatalen Entwicklung im Vermis der Maus. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Bindung des CRF an den Typ-I Rezeptor an der Entwicklung der cerebellären Neurone und Gliazellen sofort nach der Geburt beteiligt ist, noch bevor CRF seine Funktion als Neuromodulator später in der postnatalen Entwicklung einnimmt. Der CRF-Typ-II Rezeptor kommt in drei Varianten vor: dem alpha-, beta- und gamma-Typ. Er spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von cerebellären Regelkreisen und in der Entwicklung der Dendritenbäume und Afferenzen zu den Purkinjezellen. Im Gehirn von Nagetieren kommt lediglich der Subtyp alpha vor. Im Kleinhirn können zwei Isoformen des Rezeptors unterschieden werden: eine lange und eine verkürzte Form. Die lange Form des CRF-II-Rezeptors könnte an den ersten Schritten der Dendriten-Entwicklung beteiligt sein und später Auswirkungen auf die Kontrolle der strukturellen Verteilung der unreifen Regelkreise des Kleinhirns haben (Gounko et al., 2006). Beide Formen haben eine einzigartige zelluläre Verteilung. Während der postnatalen Kleinhirnentwicklung, ändert sich das Expressionsmuster der Isoformen. Das könnte darauf hinweisen, dass CRF und das verwandte Peptid Urocortin (UCN) verschiedene Rollen im unreifen und erwachsenen Kleinhirn spielen (Gounko et al., 2008). Swinny et al. (2004) konnten zeigen, dass die dauerhafte Exposition mit CRF und UCN zu einer signifikanten Hemmung des Dendritenwachstums führte. Die pränatale Gabe von Glucocorticoiden beeinflusst den Verlauf der neuronalen Entwicklung. Die Studien von Rugerio-Vargas (2007)

weisen darauf hin, dass die akute Glucocorticoidgabe während der Schwangerschaft das Entwicklungstempo des Dendritenwachstums von Purkinjezellen erhöht.

Veränderungen während der postnatalen Entwicklung sind mit hormonellen Veränderungen und einer veränderten Stressantwort verbunden. Man könnte annehmen, dass die Expression und Verteilung von CBG in der Kleinhirnrinde zu spezifischen Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung der Ratte von funktioneller Bedeutung ist. Genannt sei das Öffnen der Augen etwa ab dem siebenten Tag der Postnatalentwicklung. Es gibt keine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung: niedrige Steroidspiegel stimulieren, hohe Steroidspiegel hemmen die Expression. Es wird vermutet, dass 1,25-dihydroxyvitamin D3 in Interaktion mit dem 1,25-dihydroxyvitamin D3-Rezeptor (VDR) eine Rolle bei der Entwicklung des ZNS spielen könnte (Veenstra et al., 1998; Norman, 2008) und Alterungsprozesse verzögert (Tuohimaa, 2009). Ebenso könnte eine Beteiligung an den Funktionen des ZNS möglich sein (Lin et al., 2005; Obradovic et al., 2006; Taniura et al., 2006). Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass Vitamin D3 in der Lage ist, die Expression des Nerve Growth Factor (NGF) zu stimulieren (Neveu et al., 1994). Dieser wiederum wirkt als trophischer Faktor für Neurone (Shelton und Reichardt, 1986). Eine Studie von Bartoccini et al. (2011) weist darauf hin, dass die Anwesenheit des VDR in den nucleären Mikrodomänen notwendig ist für die Vitamin D3-induzierte Differenzierung in den embryonalen Zellen des Hippocampus. Die ausgedehnte Verbreitung des VDR in den verschiedenen Regionen des sensorischen, motorischen und limbischen Systems lässt vermuten, dass Vitamin D3 multiple funktionelle Eigenschaften im ZNS hat (Prüfer et al., 1999). Die Wirkung von Glucocorticoiden im Cerebellum könnte in diesem Zusammenhang analog sein.

Am 22. Postnataltag nimmt die Immunfärbung in den Purkinjezellen kurzzeitig zu. Etwa am 21. Entwicklungstag erfolgt der Verstoß des Jungtieres aus dem Nest, was wiederum mit einem Peak der CBG-Expression in den Purkinjezellen korreliert. Ebenso beginnen sich die Gonaden zu diesem Zeitpunkt zu entwickeln. Diese Tendenz ist ab dem 24. Tag der postnatalen Entwicklung deutlich rückläufig. Glucocorticoide vermitteln die Antwort des ZNS auf Stress auf vielen Wegen, einschließlich der Veränderung von elektrischer Erregung und synaptischen Strukturen (Joels, 2001). Zusätzlich beeinflussen Glucocorticoid-Rezeptoren die Entstehung und das Überleben von zentralen Neuronen im sich entwickelnden

und im adulten Nervensystem (Gould et al., 2000; McEwen, 1999). Hohe Spiegel von zirkulierenden Glucocorticoiden und eine unangemessene Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse stehen in Verbindung mit dem Auftreten von chronischen Depressionen (Holsboer, 2000; Pariante, 2004). Da die hippocampalen und hypothalamischen Glucocorticoide eine zentrale Rolle bei der Auslösung von negativen Rückkopplungsmechanismen, durch das Verhindern einer weiteren Freisetzung von Stresshormonen aus der Nebenniere spielen, wirken die zentralen Glucocorticoide somit auf die Stressantwort in allen physiologischen Ebenen (Herman und Cullinan, 1997).

Mit dem Beginn der Geschlechtsreife, um den 30. Entwicklungstag, zeigte sich die Kleinhirnrinde weitgehend CBG-negativ. Die Expression von CBG hat einen klaren Bezug zu Stress-Reaktionen und beeinflusst die neuronale Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Die Bildung des Steroid-Bindungshormons ist Steroidabhängig. Offenbar kann die Steroidhormon-Expression sein spezifisches Bindungsglobulin steuern (Caldwell et al., 2006).

Wir vermuten, dass das Bindungsglobulin auch beim intrazellulären Transport eine Rolle spielt und auch ein Transport in den Zellkern hinein stattfindet, vermutlich durch einen aktiven Transporter. Glucocorticoid-Rezeptoren sind aktiviert in den Kern verlagert, wo sie sich mit anderen aktivierten Glucocorticoid-Rezeptoren und Elementen der Glucocorticoid-Reaktion, sowie anderen Transkriptionsfaktoren und Regulationselementen verbinden und so die Genexpression kontrollieren (Ismaili und Garabedian, 2004).

Die Ergebnisse nach der immunhistochemischen Aufbereitung und Färbung mit dem Farbstoff JenChromPx auf Semidünnschnitten von Kleinhirnmaterial sprechen für eine intrinsische Expression des Proteins im Kleinhirn. Es ist unwahrscheinlich, dass CBG aus dem peripheren Blut die Blut-Hirn-Schranke überwindet (Pardridge et al., 1986). RT-PCR-Untersuchungen zeigten im Kleinhirn von Mäusen CBG-kodierende mRNA (Sivukhina et al., 2013).

Untersuchungen weisen darauf hin, dass CBG ähnlich einem Neurohormon transportiert und gespeichert wird. Auch die Ausschüttung des CBGs wird diskutiert. Die Bindungshormone spielen auf der Ebene der Steroid-Wirkung eine große Rolle. Noch vor wenigen Jahren war

lediglich ein Estradiol-Rezeptor bekannt, der die Wirkungen des Estradiols im Körper vermittelt. Es wurde eine betäubende Wirkung der Steroide nachgewiesen (Selye, 1941), welche später auf die Wirkung des Progestin-Stoffwechsels direkt am GABA_A-Rezeptor zurückgeführt wurde (Morrow et al., 1990, Bitran et al., 1996). Auch die Bindung der Steroide an Plasma-Membranen wurde bereits in den 60er Jahren nachgewiesen (Towle und Sze, 1983).

Möglicherweise gehen die Funktionen des CBG weit über die eines Steroidtransporters hinaus, allerdings ist die Rolle des Proteins im Gehirn nach wie vor ungeklärt. Auch die beiden Neuropeptide Oxytocin und Vasopressin, die unter anderen Bedingungen unterschiedlich reagieren, haben eine Beteiligung bei der Stressantwort und beeinflussen dadurch stressbedingtes Verhalten (Aguilera und Rabadan-Diehl, 2000, Volpi et al. 2004). Denkbar ist, dass CBG einen Einfluss auf die stressmodulierenden Eigenschaften der beiden Neuropeptide hat und als neuroaktive Substanz eine Ausschüttung dieser beeinflussen könnte (Jirikowski et al., 1993).

Die Funktionen des CBG sind folglich wahrscheinlich vielfältig. Es könnte freie Glucocorticoide puffern (Mendel, 1989) und die biologische Verfügbarkeit der Glucocorticoide könnte erhöht werden, da deren enzymatischer Abbau blockiert wird. Die Bereitstellung von Hormonen in den Zielgeweben könnten durch eine Wirkung als Transportprotein begünstigt werden (Hammond et al., 1991, Breuner und Orchinik 2002; Dey und Roychowdhury, 2003). Die Beteiligung an der Vermittlung von nicht-genomischen Effekten des Cortisols an Zellmembranen stellt eine weitere mögliche Funktion dar (Rosner et al., 1988).

Klinisch sind die inhibitorischen Effekte der Glucocorticoide auf das Wachstum von Gliomen bekannt. Die Behandlung von Gehirntumoren mit Glucocorticoiden stimuliert dabei die CBG-Expression (McLean et al., 1986; Gibelli et al., 1989; Paoletti et al., 1990; Morita et al., 1999; Kaup et al., 2001).

6 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit zeigt erstmalig mögliche qualitative Veränderungen des Steroidbindungsglobulins CBG während der Postnatalentwicklung im Cerebellum der Ratte. Die Rolle des Proteins im Gehirn ist nach wie vor ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die gewonnenen Ergebnisse korrelieren mit der Annahme, dass die Expression und Verteilung von CBG in der Kleinhirnrinde zu spezifischen Zeitpunkten in der postnatalen Entwicklung der Ratte von funktioneller Bedeutung sind. Diese sind verbunden mit einer veränderten Stressantwort sowie hormonellen Veränderungen. Die Expression des CBG zeigt einen klaren Bezug zu Stress-Reaktionen und wirkt auf die normale Gehirnentwicklung. Die morphologischen Veränderungen der Kleinhirnrinde während der postnatalen Entwicklung in Verbindung mit der gezeigten Expression von CBG, welche sich zu typischen entwicklungsbedingten Stresssensationen veränderte, untermauern diese These. Zum Zeitpunkt der Geburt findet eine ausgedehnte Neurogenese statt, die sich während dem Alterungsprozess konstant verlangsamt und später nur noch eingeschränkt im Cerebellum und Hippocampus stattfindet. Dabei kann die Neurogenese durch Exposition von Glucocorticoiden erheblich beeinträchtigt werden.

Die Funktionen des CBG sind wahrscheinlich mannigfaltig und gehen weit über die eines einfachen Steroidtransporters hinaus. Es wird angenommen, dass es ähnlich einem Neurohormon transportiert und gespeichert werden kann und es spielt vermutlich auch beim intrazellulären Transport eine Rolle und kann in den Zellkern hinein transportiert werden.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sprechen für eine intrinsische Aktivität des CBG, da es auf Grund seiner Größe die Blut-Hirn-Schranke wahrscheinlich nicht überwinden kann.

Obwohl die Rolle von CBG im Gehirn weiterhin ungeklärt bleibt, zeigen unsere Untersuchungen, verbunden mit den Beobachtungen verschiedenster Forschungsgruppen, die mannigfaltigen Potentiale von CBG und dessen Bedeutung in der komplexen Stressantwort.

Klinische Bedeutung könnten die Erkenntnisse im Bereich der Tumorbehandlung des Gehirns erzielen. Glucocorticoide zeigen inhibitorische Effekte auf das Wachstum von Gliomen. Dabei stimuliert die Behandlung die CBG-Expression. Desweiteren ist eine gezielte Beeinflussung in der Therapie von Schmerz- und Ermüdungssyndromen denkbar, sowie der Einfluss auf das räumliche Lernen und das Gedächtnis.

7 Literaturverzeichnis

- Abel JM, Witt DM, Rissmann EF. 2011. Sex differences in the cerebellum and frontal cortex: roles of estrogen receptor alpha and sex chromosome genes. *Neuroendocrinology*, 93(4): 230-40.
- Aguilera G, Rabadan- Diehl C. 2000. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary- adrenal- axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept*, 96(1-2): 23-29.
- Ahima RS, Harlan RE. 1990. Charting of type II glucocorticoid receptor- like immuno-reactivity in the rat central nervous system. *Neurosci*, 39: 579-604.
- Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann HJ, Kühnel W, Schiebler TH, Schmidt W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E, Zilles K. 1999. Cerebellum. *Kleinhirn. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (Hrsg.): Anatomie. 8. Aufl., Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 774-780.*
- Bahl R, Bradley KC, Thompson KJ, Swain RA, Rossie S, Meisel RL. 2001. Localization of protein Ser/ Thr phosphatase 5 in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 90: 101-109.
- Bartoccini E, Marini F, Damaskopoulou E, Lazzarini R, Cataldi S, Cascianelli G, Garcia MG, Albi E. 2011. Nuclear lipid microdomains regulate nuclear Vitamin D3 uptake and influence embryonic hippocampal cell differentiation. *Mol Biol Cell*, 22(17): 3022-3031.
- Biamonte F, Assenza G, Marino R, D'Amelio M, Panteri R, Caruso D, Scurati S, Yague JG, Garcia- Segura LM, Cesa R, Strata P, Melcangi RC, Keller F. 2009. Interactions between neuroactive steroids and reelin haploinsufficiency in Purkinje cell survival. *Neurobiol Dis*, 36(1): 103-15.
- Bitran D, Hilvers RJ, Frye CA, Erskine MS. 1996. Chronic anabolic-androgenic steroid treatment affects brain GABA(A) receptor-gated chloride ion transport. *Life Sci*, 58: 573-583
- Breuner CW, Orchinik M. 2002. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol*, 175(1): 99-112.
- Caldwell JD, Jirikowski GF. 2013. An active role for steroid-binding globulins: an update. *Horm Met Res*, 45: 1-8.

- Caldwell JD, Suleman F, Chou SHH, Shapiro R, Herbert Z, Jirikowski GF. 2006. Emerging roles of steroid-binding globulins. *Horm Metab Res*, 38: 206-218.
- Cannizzaro C, Plescia F, Martire M, Gagliano M, Cannizzaro G, Mantia G, Cannizzaro E. 2006. Single, intense prenatal stress decreases emotionality and enhances learning performance in the adolescent rat offspring: Interaction with a brief, daily maternal separation. *Behav Brain Res*, 169: 128-136.
- Cintra A, Zoli M, Rosen L, Agnati LF, Okret S, Wikstrom AC, Gustafsson JA, Fuxe K. 1994. Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 62: 843-897.
- Cizza G, Bernadi L, Smirne N, Maletta R, Tomaino C, Costanzo A, Gallo M, Lewis JG, Geracitano S, Grasso MB, Potenza G, Monteleone C, Brancati G, Ho JT, Torpy DJ, Bruni AC. 2011. Clinical manifestations of highly prevalent corticosteroid-binding globulin mutations in a village in southern Italy. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(10): E1684-93.
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G. 2005. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*, 57(4): 427-50.
- Dey R, Roychowdhury P. 2003. Homology model of human corticosteroid binding globulin: a study of its steroid binding ability and a plausible mechanism of steroid hormone release at the site of inflammation. *J Mol Model*, 9(3): 183-189.
- Fuxe K, Wikstrom AC, Okret S, Agnati LF, Harfstrand A, Yu ZY, Granholm L, Zoli M, Vale W, Gustafsson JA. 1985. Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology*, 117: 1803-1812.
- Gibelli N, Zibera C, Butti G, Assietti R, Sica G, Scerrati M, Iacopino F, Roselli R, Paoletti P, Robustelli della Cuna G, et al. 1989. Hormonal modulation of brain tumour growth: a cell culture study. *Acta Neurochir (Wien)*, 101(3-4): 129-33.
- Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N. 2000. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry*, 48:715-720.

- Goukko NV, Gramsbergen A, van der Want JJ. 2008. Localization and functional roles of corticotrophin – releasing factor receptor type 2 in the cerebellum. *Cerebellum*, 7(1): 4-8.
- Goukko NV, Kalicharan D, Rybakin V, Gramsbergen A, van der Want J. 2006. The dynamic developmental localization of the full-length corticotrophin – releasing factor receptor type 2 in rat cerebellum, *Eur J Neurosci*, 23(12): 3217-24.
- Hammond GL, Smith CL. 1991. Ontogeny of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the rat. *Endocrinology*, 128: 983-988.
- Herbert Z, Jirikowski GF, Petrusz P, Englof I, Caldwell JD. 2003. Distribution of androgen binding globulin in the rat hypothalamo-hypophyseal system, co-localization with oxytocin. *Brain Research*, 992: 151-158.
- Herbert Z, Pollak EI, Caldwell JD, Jirikowski GF. 2003. Subcellular localization of SHBG in the rat hypothalamus and pituitary. *Society for Neurosci, Abstr*, 25: 610.3.
- Herman JP, Cullinan WE. 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*, 20: 78-84
- Holsboer F. 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, 23: 477-501.
- Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. 1986. Specific binding of human corticosteroid-binding globulin to cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(10): 3253-3256.
- Hsu BR, Kuhn RW. 1988. The role of the adrenal in generating the diurnal variation in circulating levels of corticosteroid-binding globulin in the rat. *Endocrinology*, 122(2): 421-426.
- Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 2001. Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci*, 19(4): 415-25.
- Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK. 2002. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res*, 950: 52-63.
- Ismaili N, Garabedian MJ. 2004. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann NY Acad Sci*, 1024: 86-101.

- Janmaat S, Akwa Y, Doulazmi M, Bakouche J, Gautheron V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Luiten P, Groothuis T, Baulieu EE, Mariani J, Sherrard RM, Frederic F. 2011. Age-related Purkinje cell death is steroid dependent: ROR alpha haplo-insufficiency impairs plasma and cerebellar steroids and Purkinje cell survival. *Age (Dordr)*, 33(4): 565-78.
- Jirikowski GF, McGimsey WC, Caldwell JD, Sar M. 1993. Distribution of oxytocinergic glucocorticoid target neurons in the rat hypothalamus. *Horm Metab Res*, 25(10): 543-544.
- Jirikowski GF, Pusch L, Möpert B, Herbert Z, Caldwell JD. 2007. Expression of corticosteroid binding globulin in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat*. 34(1-2): 22-8.
- Joels M. 2001. Corticosteroid actions in the hippocampus. *J Neuroendocrinol*, 13: 657-669.
- Kaup B, Schindler I, Knüpfer H, Schlenzka A, Preiss R, Knüpfer MM. 2001. Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *J Neurooncol*, 51(2): 105-10.
- King JS, Bishop GA. 2002. The distribution and cellular localization of CRF-R1 in the vermis of the postnatal mouse cerebellum. *Exp Neurol*, 178(2): 175-85.
- Kitraki E, Karandrea D, Kittas C. 1999. Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 69(5): 331-8.
- Koibuchi N. 2008. Hormonal regulation of cerebellar development and plasticity. *Cerebellum*, 7: 1-3.
- Kosten TA, Lee HJ, Kim JJ. 2006. Early life stress impairs fear conditioning in adult male and female rats. *Brain Res*, 1087: 142-150.
- Kosten TA, Lee HJ, Kim JJ, Misserendino MJD, Bombace JC. 2005. Sex-selective effects of neonatal isolation on fear conditioning and foot shock sensitivity. *Behav Brain Res*, 157: 235-244.
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM. 2004. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci*, 24(26): 5913-21.

- Lewis JG, Möpert B, Shand BI, Doogue MP, Soule SG, Frampton CM, Elder PA. 2006. Plasma variation of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin. *Horm Metab Res*, 38(4): 241-5.
- Lin AM, Chen KB, Chao PL. 2005. Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann NY Acad Sci*, 1053: 319-329.
- Llorente R, Gallardo ML, Berzal AL, Prada C, Garcia-Sequera LM, Viveros MP. 2009. Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int J Dev Neurosci*, 27(3): 233-41.
- McEwen BS. 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 22: 105-122.
- Mc Gimsey WC, Cidlowski JA, Stumpf WE, Sar M. 1991. Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain, pituitary, liver and thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinology*, 129: 3064-3072.
- McKay LI, Cidlowski JA. 2000. Hormones of the Adrenal Cortex. *Cancer Medicine*, 6th Edition, 2000, NBK 20779.
- McLean JS, Frame MC, Freshney RI, Vaughan PF, Mackie AE, Singer I. 1986. Phenotypic modification of human glioma and non-small cell lung carcinoma by glucocorticoids and other agents. *Anticancer Res*, 6(5): 1101-6.
- Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, Koolhaas JM. 1999. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol*, 11: 925-933.
- Mendel CM. 1989. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev*, 10(3): 232-74.
- Möpert B, Herbert Z, Caldwell JD, Jirikowski GF. 2006. Expression of corticosterone binding globulin CBG in the rat hypothalamus. *Hormone and Metabolic Research*, 38: 245-251.
- Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M. 1996. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res*, 26: 235-269.

- Morita K, Tsuruo Y, Ishimura K, Her S, Bell RA, Wong DL. 1999. Influence of serum-free culture conditions on steroid 5 α -reductase mRNA expression in rat C6 glioma. *Brain Res*, 830(1): 179-82.
- Morrow AL, Pace JR, Purdy RH, Paul SM. 1990. Characterization of steroid interactions with gamma-aminobutyric acid receptor-gated chloride channels: evidence for multiple steroid recognition sites. *Molecular Pharmacology*, 37: 263-270.
- Neveu I, Naveilhan P, Jehan F, Baudet C, Wion D, De Luca HF, Brachet P. 1994. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 24: 70-76.
- Noguchi KK, Lan K, Smith DJ, Swiney BS, Farber NB. 2011. Glucocorticoid receptor stimulation and the regulation of neonatal cerebellar neural progenitor cell apoptosis. *Neurobiol Dis*, 43(2): 356-63.
- Noguchi KK, Walls KC, Wozniac DF, Olney JW, Roth KA, Farber NB. 2008. Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death. *Cell Death Differ*, 15(10): 1582-92.
- Norman AW. 2008. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin*, 88: 491-499.
- Obradovic D, Gronemeyer H, Lutz B, Rein T. 2006. Cross-talk of vitamin D and glucocorticoids in hippocampal cells. *J Neurochem*, 96: 500-509.
- Paoletti P, Butti G, Zibera C, Scerrati M, Gibelli N, Roselli R, Magrassi L, Sica G, Rossi G, Robustelli della Cuna G. 1990. Characteristics and biological role of steroid hormone receptors in neuroepithelial tumors. *J Neurosurg*, 73(5): 736-42.
- Pardridge WM, Eisenberg J, Fierer G, Kuhn RW. 1986. CBG does not restrict blood-brain barrier corticosterone transport in rabbits. *Am J Physiol*, 251(2 Pt 1): 204-208.
- Pariente CM. 2004. Glucocorticoid receptor function in vitro in patients with major depression. *Stress*, 7: 209-219.
- Perrot-Applanat M, David-Ferreira JF, David-Ferreira KL. 1981. Immunocytochemical localization of corticosteroid-binding globulin (CBG) in guinea pig hepatocytes. *Endocrinology*, 109(5): 1625-1633.

- Persengiev SP. 2001. The neuroprotective and antiapoptotic effects of melatonin in cerebellar neurons involve glucocorticoid receptor and p130 signal pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 77(2-3): 151-8.
- Prüfer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. 1999. Distribution of 1,25-dihydroxy-vitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat*, 16(2): 135-45.
- Prya CR, Bettschend D, Nanz-Bahr NI, Feldon J. 2003. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on conditioned stimulus, context, and spatial learning and memory in adult rats. *Behav Neurosci*, 117: 883-893.
- Pusch L, Wegmann S, Caldwell JD, Jirikowski GF. 2009. Expression of corticosteroid-binding globulin in human astrocytoma cell line. *Cell Mol Neurobiol*, 29: 583-588.
- Richard RM, Helbling JC, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M, Pourtau L, Konsman JP, Mormede P, Moisan MP. 2010. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology*, 151(2): 649-659.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Singer CJ, Nakhla AM. 1988. Are corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin hormones? *Ann NY Acad Sci*, 538: 137-45. Review.
- Rossie S, Jayachandran H, Meisel RL. 2006. Cellular co-localization of protein phosphatase 5 and glucocorticoid receptors in rat brain. *Brain Res*, 1111(1): 1-11.
- Rugiero-Vargas C, Ramirez-Escoto M, DelaRosa-Rugiero C, Rivas-Manzano P. 2007. Prenatal corticosterone influences the trajectory of neuronal development, delaying or accelerating aspects of the Purkinje cell differentiation. *Histol Histopathol*, 22(9): 963-9.
- Rune GM, Frotscher M. 2005. Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience*, 136(3): 833-42.
- Sapolsky RM. 1993. Potential behavioral modification of glucocorticoid damage to the hippocampus. *Behav Brain Res*, 57(2): 175-182.
- Selye H. 1941. The anesthetic effect of steroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med*, 46: 116-121.

- Shelton DL, Reichardt LF. 1986. Studies on the expression of the beta nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: level and regional distribution of NGF mRNA suggest that NGF functions as a trophic factor for several distinct populations of neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 83(8): 2714-2718.
- Schiebler TH, Korf HW. 2007. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. Steinkopff-Verlag, 786.
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. 2010. *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 167-168.
- Sivukhina E, Helbling JC, Minni AM, Schäfer HH, Pallet V, Jirikowski GF, Moisan MP. 2013. Intrinsic expression of transcortin in neural cells of the mouse brain: a histochemical and molecular study. *J Exp Biol*, 216(Pt 2): 245-52.
- Sivukhina E, Jirikowski GF, Bernstein HG, Lewis JG, Herbert Z. 2006. Expression of corticosteroid-binding protein in the human hypothalamus, co-localization with oxytocin and vasopressin. *Horm Metab Res*, 38(4): 253-9.
- Strel'chyonok OA, Avva Kumov GV. 1991. Interaction of human CBG with cell membranes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40(4-6): 795-803.
- Swinny JD, Metzger F, Ijkema-Paassen J, Goukko NV, Gramsbergen A, van der Want JJ. 2004. Corticotropin-releasing factor and urocortin differentially modulate rat Purkinje cell dendritic outgrowth and differentiation in vitro. *Eur J Neurosci*, 19(7): 1749-58.
- Tam EWY, Chau V, Ferriero DM, Barkovich AJ, Poskitt KJ, Studholme C, Fok EDY, Grunau RE, Glidden DV, Miller SP. 2011. Preterm cerebellar growth impairment after post-natal exposure to glucocorticoids. *Sci Transl Med* 3, 105ra 105.
- Taniura H, Ito M, Sanada N, Kuramoto N, Ohno Y, Nakamichi N, Yoneda Y. 2006. Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons. *J Neurosci Res*, 83: 1179-1189.
- Tasker JG. 2006. Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration, *Obesity (Silver Spring)*, Aug, 14 Suppl. 5: 259S-265S.
- Towle AC, Sze PY. 1983. Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J Steroid Biochem*, 18: 135-143.

- Trepel M. 2004. Kleinhirn (Cerebellum). Neuroanatomie, Struktur und Funktion. 3. Aufl., Urban&Fischer-Verlag, München Jena, 149-166.
- Tuohimaa P. 2009. Vitamin D and aging. J Steroid Biochem Mol Biol, 114: 78-84.
- Uysal N, Ozdemir D, Dayi A, Yalaz G, Baltaci AK, Bediz CS. 2005. Effects of maternal deprivation on melatonin production and cognition in adolescent male and female rats. Neuroendocrinol Lett, 26: 555-560.
- Veenstra TD, Prüfer K, Koenigsberger C, Brimijoin SW, Grande JP, Kumar R. 1998. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in the central nervous system of the rat embryo. Brain Research, 804(2): 193-205.
- Volpi S, Rabadan-Diehl C, Aguilera G. 2004. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis and stress adaptation. Stress, 7(2): 75-83.
- Wang J, Barak LS, Mook RA Jr, Chen W. 2011. Glucocorticoid hedgehog agonists in neurogenesis. Vitam Horm, 87: 207-15.
- Welsch U. 2006. Kleinhirn. Welsch U (Hrsg.): Lehrbuch Histologie. 2. Aufl., Urban&Fischer-Verlag, München Jena, 624-628.
- Wilber AA, Wellman CL. 2009. Neonatal maternal separation alters the development of glucocorticoid receptor expression in the interpositus nucleus of the cerebellum. In J Dev Neurosci, 27(7): 649-54.
- Zamudio-Bulcock PA, Everett J, Harteneck C, Valenzuela CF. 2011. Activation of steroid-sensitive TRPM3 channels potentiates glutamatergic transmission at cerebellar Purkinje neurons from developing rats. J Neurochem, 119(3): 474-85.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Name Stefanie Lippold
Geburtsdatum u. -ort 30.05.1983 in Greiz
Familienstand ledig

AUSBILDUNG

seit 04/2012 Beschäftigung als **Assistenz Zahnärztin** in Garmisch-Partenkirchen und Murnau a.Staffelsee

01/2012 **Approbation** als Zahnärztin

seit 02/2010 Doktorand am **Institut für Anatomie II**
Teichgraben 7, 07740 Jena

Thema der Promotion: „*Expression von Corticosteroid-bindendem Globulin/ CBG im Cerebellum der Ratte während der Postnatal-entwicklung*“

10/2006 – 03/2012 **Friedrich-Schiller-Universität Jena**
Studium der Zahnmedizin

10/2005 – 09/2006 Beschäftigung als **Gesundheits- und Krankenpflegerin** in der Intensivpflege

10/2004 – 09/2005 **Friedrich-Schiller-Universität Jena**
begonnenes Studium der Volkswirtschaftslehre

09/2001 – 08/2004 **Kreiskrankenhaus Greiz GmbH**
Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin

08/1993 – 07/2001 **1. Staatliches Gymnasium Greiz**
Abschluss: Abitur

8.2 Danksagung

Ein großer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Gustav F. Jirikowski, der mir dieses Thema freundlich überließ und mir stets mit viel Geduld und einem offenen Ohr zur Seite stand.

Weiterhin danke ich Herrn Oberarzt Dr. Hartmut Oehring, der sich immer die nötige Zeit nahm, mich bei der Anfertigung der Semidünnschnitte unterstützte und mir über die komplette Zeit im Labor und während der Anfertigung dieser Arbeit mit Rat und Tat behilflich war.

Meiner lieben Freundin und ehemaligen Kommilitonin Kristin Piontek. Ohne sie wäre die Arbeit niemals zustande gekommen. Unsere gemeinsame Laborzeit, tausende Telefonate und natürlich all die anderen schönen Erlebnisse während unseres Studiums werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Besonderer Dank gilt auch Frau Sabine Hitschke, Frau Alida Braunschweig und Dr. Wilfried Dölz. Sie sorgten stets dafür, dass die Laborarbeit reibungslos verlief und unterstützten mich tatkräftig in allen Belangen. Danke für die Geduld!

Ich danke von Herzen meinen Eltern Ulrich und Margitta Lippold, dass sie immer an meiner Seite waren. Ohne deren finanzielle und mentale Unterstützung wäre vieles nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich mich bei Marcel Sachsenweger bedanken. Ohne ihn geht eigentlich gar nichts! Danke für alles...

8.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Stefanie Lippold, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Gustav Jirikowski, OA Dr. Hartmut Oehring, Sabine Hitschke, Alida Braunschweig, Dr. Wilfried Dölz,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Mittenwald, den 20.12.2013

Stefanie Lippold